

Contribuição da Microbiologia Preditiva na análise de cremes de pasteleiro

Por: João Carlos Fernandes Duarte

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientador: Professora Doutora Ana Lúcia Leitão

Lisboa

Abril de 2011

Copyright © João Carlos Fernandes Duarte, FCT/UNL e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

A entrega, e posterior defesa, desta Dissertação implica o fim de mais um ciclo na minha vida e o início de muitos mais que virão. Nele, existiram muitas pessoas que me apoiaram em todos os momentos, bons e maus, e que gostaria de dar o devido reconhecimento e agradecimento.

À minha namorada, Ana Filipa, que me acompanhou por todo o processo, pelo seu apoio, compreensão, paciência, conselhos, correcções quando necessárias, carinho, amor e muita amizade.

Aos meus pais, José Carlos e Maria Teresa, sem os quais este ciclo não teria sido possível, e por saber que posso sempre contar com os seus melhores conselhos, hoje e sempre.

À minha irmã, Ana Rita, que sempre se dispôs a ajudar-me (mesmo que eu diga permanentemente que não), e que sei que vai estar presente sempre que eu precisar.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, e aos docentes que me acompanharam, pelos 7 maravilhosos anos que passei nesta instituição, e que contribuíram, em muito, para o meu desenvolvimento como ser humano.

À Professora Doutora Ana Lúcia Leitão, pela sua orientação, conselhos, sugestões, constante preocupação e insistência para comigo.

Ao Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira (ISA-UTL), por todo o apoio inicial, por me ter dado a conhecer a Microbiologia Preditiva, pelos artigos emprestados, pelas informações dadas e acessibilidade.

À minha colega de trabalho Nídia Vieira, por toda a ajuda, informação, disponibilidade e apoio dados, e aos meus restantes colegas de trabalho.

To my colleagues Bas Walraven and Erwin De Waele, for the instant availability showed to help me, despite the fact that they are in a different country, they were always ready to answer my questions.

Por fim, aos meus amigos e colegas, que me acompanharam por todo o processo, pelo apoio e camaradagem, sempre prontos para aliviar qualquer tipo de *stress*.

Objectivo e Organização do trabalho

A Microbiologia Preditiva tem vindo a ganhar, aos poucos, um lugar de destaque dentro da comunidade científica, que, timidamente, tem vindo a conhecer e a aproveitar as suas mais-valias. As indústrias alimentares também têm prestado atenção aos desenvolvimentos desta nova área, utilizando, cada vez mais, as suas ferramentas em processos diários, relativos à qualidade e segurança dos seus produtos.

Neste trabalho, irá ser idealizada a inserção desta abordagem à indústria de produtos de pastelaria e, dentro deste tipo de produtos, serão analisados os cremes de pasteleiro. Na empresa que será objecto de estudo, este tipo de produtos, corresponde à maior percentagem de negócio, reflectindo-se em milhares de euros anuais. São, também, os produtos que correm maiores riscos em termos de qualidade e segurança alimentar, devido às suas características, favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, pois após preparação tornam-se um meio com muita água e muito açúcar disponíveis. Assim, estes cremes representam uma das maiores preocupações para a empresa e são sujeitos a vários cuidados ao longo da sua fabricação.

O objectivo principal desta dissertação será então, determinar a capacidade de utilização de ferramentas de Microbiologia Preditiva para estabelecer prazos de validade, recorrendo a *software* disponível de forma gratuita através da internet, dentro de uma empresa pertencente à indústria da pastelaria, comparar os resultados obtidos com os protocolos existentes para determinação de validades, dentro da empresa, e verificar se as ferramentas têm potencialidades para serem utilizadas activamente no dia-a-dia, como se verifica noutras indústrias alimentares. Os produtos em vista, para estabelecer prazos, serão cremes pasteleiro, que se podem dividir em dois tipos diferentes: preparado em pó para a elaboração de cremes de pasteleiro (a frio e a quente) e cremes de pasteleiro prontos a utilizar.

A dissertação estará dividida em quatro partes, sendo a primeira uma breve introdução à abordagem que irá ser efectuada, seguida por uma apresentação da Microbiologia Preditiva em si e das ferramentas que irão ser utilizadas ao longo do trabalho. Em terceiro, irá ser feita uma apresentação do caso de estudo, empresa e tipo de produtos a analisar. Por fim, irão ser apresentados os resultados e a respectiva discussão dos mesmos, conducentes a algumas reflexões e perspectivas futuras.

Sumário

A Microbiologia Preditiva resulta da associação de quatro áreas científicas distintas: microbiologia, informática, química e matemática. Como ponto de referência, podemos dizer que a análise de resultados segundo esta técnica surgiu na década de 70, do século XX, como resposta à crescente necessidade de conhecer o impacto da patogenicidade de origem alimentar nas populações, aliada ao desenvolvimento dos sistemas de segurança alimentar. A área da Microbiologia Preditiva tem vindo a sofrer constantes desenvolvimentos ao longo das últimas décadas. A aplicação dos conhecimentos e resultados possíveis de obter a partir desta tem ajudado a indústria alimentar, no que respeita à análise de riscos, à implementação de protocolos de segurança alimentar nas empresas, HACCP e determinação de prazos de validade, com resultados muito satisfatórios, funcionando já como ferramenta em alguns casos.

Neste trabalho, foram testados *softwares* de Microbiologia Preditiva, de acesso livre através da internet, com vista a verificar se os mesmos poderiam ser considerados na tomada de decisões relativas a prazos de validade na indústria alimentar. Os produtos em questão foram preparados em pó para a elaboração de cremes de pasteleiro e cremes de pasteleiro prontos a utilizar. Foi então verificada a possibilidade da utilização da Microbiologia Preditiva numa indústria de pastelaria, área pouco estudada por parte da comunidade científica.

Termos chave: Microbiologia Preditiva; Microbiologia; Creme de Pasteleiro; Prazo de Validade.

Abstract

Predictive Microbiology results from the interaction of four distinct fields of science: microbiology, informatics, chemistry and mathematics. As a reference point, it's possible to say that the analysis of results provided by this technique appeared in mid-70's, of the XX century, as an answer to the rising need of knowing about the impact of food-borne diseases in populations, together with the development of food safety systems. Since then, and in the past decades, predictive microbiology has suffered constant developments. The application of the knowledge's and results obtained with these tools has helped the food industry in risks analysis, implementation of food safety protocols in the companies, HACCP, and in the determination of the product's shelf-life and storage, with very satisfying results, being in some cases already used as a working tool.

In this work, some free access microbiology software was tested in order to investigate if it was possible to adapt and consider the results regarding shelf-life determination for the food industry. The products that were considered are powder custard cream and ready-to-use custard cream. Therefore, it was tested the utilization of the predictive microbiology approach within a pastry industry, where very little is known regarding food industry and scientific community.

Keywords: Predictive Microbiology; Microbiology; Custard Cream; Shelf-life.

Índice de Matérias

Agradecimentos	III
Objectivo e Organização do trabalho.....	V
Sumário	VII
Abstract.....	IX
Índice de Matérias.....	XI
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas.....	XV
Simbologia.....	XVII
Introdução.....	1
Capítulo 1 - Microbiologia Preditiva	5
1.1 História.....	6
1.2 Factores Intrínsecos e Extrínsecos	8
1.3 Modelos de Microbiologia Preditiva	9
1.4 Fases de crescimento microbiológico	10
1.5 Usos e limitações.....	12
1.6 Futuro da Microbiologia Preditiva	13
Capítulo 2 - Ferramentas de Microbiologia Preditiva	15
2.1 Programas utilizados na Microbiologia Preditiva	16
2.2 <i>ComBase</i>	17
2.3 <i>Pathogen Modeling Program</i>	23
Capítulo 3 - Caso de Estudo	27
3.1 A empresa.....	28
3.2 O produto	29

3.3 Parâmetros microbiológicos	31
3.4 Prazos de validade	35
Capítulo 4 - Resultados	37
4.1 Cremes a Frio	40
4.1.1 CF1	40
4.1.2 CF2	43
4.1.4 CF3	46
4.2 Cremes a Quente	49
4.2.1 CQ1	49
4.2.2 CQ2	51
4.3 Recheios Líquidos	54
4.3.1 RL1	54
4.3.2 RL2	54
4.3.3 RL3	57
4.3.4 RL4	60
4.3.5 RL5	61
Capítulo 5 - Discussão de Resultados	63
Conclusão	67
Perspectivas futuras	69
Referências Bibliográficas	71

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Padrão típico de uma curva de crescimento microbiano	11
Figura 2.1 - Página inicial da <i>ComBase</i>	17
Figura 2.2 - Página do <i>ComBase Browser</i>	18
Figura 2.3 - Sumário de resultados dentro do <i>ComBase Browser</i>	18
Figura 2.4 - Detalhes de resultados dentro do <i>ComBase Browser</i>	19
Figura 2.5 - Comparação dos resultados obtidos no <i>ComBase Browser</i> com a previsão do <i>ComBase Predictor</i>	19
Figura 2.6 - <i>ComBase Modelling Toolbox</i>	20
Figura 2.7 - Página inicial do <i>ComBase Predictor</i>	21
Figura 2.8 - Previsão múltipla, utilizando <i>ComBase Predictor</i>	22
Figura 2.9 - Página inicial do PMP	23
Figura 2.10 - PMP Online	24
Figura 2.11 - Escolha dos modelos preditivos, a partir do tipo de modelo	24
Figura 2.12 - Escolha dos modelos preditivos, a partir da espécie de microrganismos	25
Figura 2.13 - Apresentação de resultados de previsão pelo PMP Online	26
Figura 4.1 - Exemplo de erro devido a valores fora dos limites microbiológicos.....	39
Figura 4.2 - Previsão de crescimento para CF1, em 48 horas	40
Figura 4.3 - Previsões de crescimento, para CF1	41
Figura 4.4 - Previsão de crescimento para CF2, em 32 horas	43
Figura 4.5 - Previsões de crescimento, para CF2	44
Figura 4.6 - Previsão de crescimento para CF3, em 35 horas	46
Figura 4.7 - Previsões de crescimento, para CF3	47
Figura 4.8 - Previsão de crescimento para CQ1, em 72 horas	49

Figura 4.9 - Previsão de crescimento para CQ2, em 72 horas.....	51
Figura 4.10 - Previsões de crescimento, para CQ2.	52
Figura 4.11 - Previsão de crescimento para RL1 e RL2, em 96 horas.	54
Figura 4.12 - Previsões de crescimento, para RL1 e RL2.	55
Figura 4.13 - Previsão de crescimento para RL3, em 96 horas	57
Figura 4.14 - Previsões de crescimento, para RL3.....	58
Figura 4.15 - Previsão de crescimento para RL5, em 72 horas	61

Índice de Tabelas

Tabela1 - Microbiologia Preditiva como ferramenta auxiliar dos princípios de HACCP.....	2
Tabela 1.1 - Classificação de alguns modelos de Microbiologia Preditiva.....	10
Tabela 2.1 - Programas informáticos associados à Microbiologia Preditiva, disponíveis na internet ..	16
Tabela 3.1 - Vendas do ano de 2010, para o TOP 5 de Cremes em Pó.....	30
Tabela 3.2 - Vendas do ano de 2010, para o TOP 5 de Recheios Líquidos	30
Tabela 3.3 - Validade dos cremes de pasteleiro em estudo.....	36
Tabela 4.1 - Intervalos dos parâmetros microbiológicos, de acordo com as duas ferramentas.....	38
Tabela 4.2 - Valores da concentração de células viáveis em CF1.....	40
Tabela 4.3 - Valores de concentração ao longo do tempo em CF1	41
Tabela 4.4 - Valores da concentração de células viáveis em CF2	43
Tabela 4.5 - Valores de concentração ao longo do tempo em CF2.....	44
Tabela 4.6 - Valores da concentração de células viáveis em CF3.....	46
Tabela 4.7 - Valores de concentração ao longo do tempo em CF3.....	47
Tabela 4.8 - Valores da concentração de células viáveis em CQ1	49
Tabela 4.9 - Valores da concentração de células viáveis em CQ2.....	51
Tabela 4.10 - Valores de concentração ao longo do tempo em CQ2	52
Tabela 4.11 - Valores da concentração de células viáveis em RL1 e RL2.....	54
Tabela 4.12 - Valores de concentração ao longo do tempo em RL1 e RL2.....	55
Tabela 4.13 - Valores da concentração de células viáveis em RL3	57
Tabela 4.14 - Valores de concentração ao longo do tempo em RL3.....	58
Tabela 4.15 - Valores da concentração de células viáveis em RL5	61

Simbologia

HACCP - *Hazard Analysis and Critical Control Point*. Em português denomina-se "Análise dos Perigos e Pontos de Controlo Críticos".

E. coli - *Escherichia coli*

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

a_w - Actividade da água

PMP - *Pathogen Modeling Program*

USDA - United States Department of Agriculture

USDA-ARS - United States Department Of Agriculture - Agriculture Research Service

UFC - Unidades Formadoras de Colónias

ENF - Empresa de Nome Fictício, S.A.

ISO - International Organization for Standardization

BRC - British Retail Consortium

I&D - Investigação e Desenvolvimento

CF - Creme a Frio

CQ - Creme a Quente

RL - Recheio Líquido

Introdução

A Microbiologia Preditiva surge como uma possível alternativa na determinação de prazos de validade, para além de poder ser uma óptima ferramenta em análises de risco e procedimentos de qualidade, uma vez que considera que é o ambiente a que o produto está exposto que irá determinar o crescimento e o comportamento microbiano e como tal encara, de igual maneira, uma série de factores intrínsecos e extrínsecos que têm influência na degradação do produto [1, 2]. Este método resulta da associação entre microbiologia, matemática, química e informática, e considera modelos obtidos em estudos de determinados microrganismos em condições controladas, permitindo conhecer as diferentes fases de crescimento dos microrganismos em questão. Os programas de Microbiologia Preditiva permitem variar as condições em que o produto se encontra e determinar as variações que poderão surgir no crescimento e desenvolvimento microbiológico, dentro dessas mesmas condições [1, 3, 4].

A década de 1970 é muitas vezes considerada como o início de uma tomada de consciência dos problemas relativos à segurança alimentar, em grande parte devido às grandes alterações demográficas e sociais, e aos avanços tecnológicos que se verificaram desde essa década. O aumento da globalização das indústrias alimentares, um comércio cada vez mais internacionalizado e a crescente exigência de qualidade por parte dos consumidores, quer nas reduções de aditivos quer no processamento dos alimentos, foram factores que também vieram contribuir para a crescente preocupação e atenção para com a segurança dos alimentos [2]. Um estudo publicado em 1997, por Robert V. Tauxe, veio demonstrar que, por volta da década de 1970, se relacionou o aparecimento de uma série de microrganismos patogénicos nos alimentos com as alterações observadas nestes. Exemplos desses microrganismos foram espécies de *Campylobacter*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria*, entre outras [2, 5].

A partir da década de 1970, a Microbiologia Preditiva tem sido trabalhada, estudada e actualizada, sendo que os primeiros artigos relativos a esta foram publicados a meio da década de 1980 e as primeiras conferências foram realizadas nos inícios da década de 1990 [3].

Hoje em dia, os estudos e actualizações de informação feitos nos últimos anos permitiram a criação de extensas bases de dados que permitem aos programas de Microbiologia Preditiva funcionarem mais rapidamente, diminuindo o grau de incerteza em relação aos resultados provenientes dos mesmos. Alguns desses programas estão disponíveis na internet, tanto de acesso livre como acesso pago, sendo que se torna possível encontrar uma série de modelos distintos para um mesmo propósito. No entanto, é sempre aconselhada uma leitura e entendimento das especificações de cada um para o seu melhor funcionamento. Apesar de ser essencial na construção de ferramentas de

Microbiologia Preditiva, a matemática dos diferentes modelos não será aqui abordada, mas é possível encontrar muitos estudos e literatura sobre a mesma [3, 6-10].

Mais recentemente, estes modelos têm sido separados em dois tipos: Modelos de População (*population models*), que consideram a população microbiana como um todo e actuam de uma forma mais macroscópica, considerando essencialmente factores como a temperatura ou pH, por exemplo; e Modelos Baseados no Indivíduo (*individual-based models*), que consideram cada organismo como um indivíduo único, e têm em conta, para além dos factores considerados pelos modelos de população, factores como idade, diâmetro ou a massa de cada microrganismo. Estes últimos permitem ter em conta a dinâmica de cada população e são vistos como bastante úteis, essencialmente, nos casos em que os resultados reais observados, num determinado produto, não são consistentes com os resultados obtidos em laboratório e disponíveis na maior parte dos modelos [11].

Apesar de não poderem substituir as análises microbianas laboratoriais, as ferramentas de Microbiologia Preditiva têm um valor inestimável, uma vez que permitem obter resultados a uma velocidade rápida e fornecem informação que auxilia grandemente quem faz jus das mesmas. Uma das grandes áreas onde a utilização destas ferramentas pode, também, ser útil é na implementação de protocolos de HACCP nas empresas de produtos alimentares. As primeiras aproximações entre as duas áreas fizeram-se com a intenção de auxiliar e facilitar o processo de implementação dos protocolos, tentar reduzir a necessidade de um grande número de análises laboratoriais e, consequentemente, diminuir o consumo de amostras necessárias e os custos inerentes a essas análises. Sendo que a implementação e aceitação de protocolos de HACCP força um conhecimento de uma série de variáveis que influenciam a segurança de todo um processo, a abordagem da Microbiologia Preditiva permite descrever e conhecer os efeitos dessas variáveis no crescimento e desenvolvimento microbiano, assim como na sua sobrevivência e inactivação. Deste modo, a modelação executada, a partir das ferramentas preditivas, ajuda nas análises preliminares para a identificação dos perigos, designação de pontos de controlo críticos e no estabelecimento de acções correctivas quando necessário. A tabela seguinte sintetiza alguns pontos onde a Microbiologia Preditiva pode auxiliar o protocolo de HACCP (adaptado de [1]):

Tabela1 - Microbiologia Preditiva como ferramenta auxiliar dos princípios de HACCP (adaptado de [1])

Microbiologia Preditiva	HACCP
Identificação de microrganismos patogénicos relevantes	Identificação de perigos potenciais e avaliação da gravidade dos mesmos
Identificação do aumento do risco	Identificação de pontos de controlo críticos
Comparação das previsões com os critérios estabelecidos	Determinação de limites de controlo críticos
Incorporação da informação disponível nos sistemas de monitorização de crescimento microbiano	Criação de sistemas de monitorização

Deste modo, a Microbiologia Preditiva pode ser vista e utilizada como uma extensão do protocolo de HACCP, tendo sempre em conta que uma previsão correcta e fiável, dentro de um processo de produção bastante complexo, como é o caso das indústrias alimentares, torna-se algo inexecutável e ainda um pouco utópico [1, 2, 4].

Apesar de se encontrar em grande expansão, os estudos realizados dentro desta nova área da Microbiologia Preditiva têm tido como principais alvos as grandes indústrias alimentares, como é o caso do tratamento de carnes, peixe e indústrias de conserva [12]. Dentro da indústria da pastelaria, indústria focada neste trabalho, os artigos e investigações existentes são quase nulos, ou de difícil acesso. Assim, o tratamento de dados, dentro dos programas de Microbiologia Preditiva, será feito recorrendo à reduzida informação que alguns dos programas têm disponível.

Capítulo 1 - Microbiologia Preditiva

A ideia base que sustenta a concepção de Microbiologia Preditiva é que as respostas dos microrganismos aos diferentes factores ambientais são reprodutíveis e, recorrendo a informação obtida por observações feitas no passado, torna-se possível prever e quantificar a evolução de populações de microrganismos, expostos a determinados factores (intrínsecos e extrínsecos), ao longo do tempo [3, 11].

Em termos de indústria alimentar, a possibilidade de prever o comportamento dos microrganismos, essencialmente dos patogénicos, veio a revelar-se uma vertente bastante interessante e importante com vista ao objectivo da segurança e qualidade alimentar. Assim sendo, não será de estranhar o rápido interesse da indústria relativamente a esta nova vertente científica, uma vez que fornece ferramentas importantes para determinar as consequências do processamento e manuseamento crescente dos alimentos, em termos de crescimento, sobrevivência e até inactivação dos microrganismos daí inerentes [13]. Aparecendo, assim, a chamada Microbiologia Preditiva Alimentar.

A Microbiologia Preditiva resulta da associação entre diferentes disciplinas, essencialmente a matemática, química, informática e a própria microbiologia [1, 4]. Baseia-se na aplicação de diversos modelos matemáticos, que permitem prever o crescimento microbiano em determinadas condições ambientais, vindo, deste modo, providenciar uma determinação quantitativa, em contraste com as determinações qualitativas, para descrever uma população microbiana num dado alimento [12].

1.1 História

O uso de modelos matemáticos para descrever o crescimento microbiano nos alimentos não tem uma origem assim tão recente. A origem desses modelos preditivos é, muitas vezes, referenciada como sendo do ano de 1922, quando foram descritos, por Esty e Meyer, processos térmicos de inactivação de *Clostridium botulinum* do tipo A, utilizando modelos descritivos do processo, com grande margem de segurança [2].

No entanto, os modelos preditivos só receberam a devida atenção por volta da década de 70, século XX, quando se verificou um grande aumento nos casos de doenças de origem alimentar. Este aumento terá sido devido às alterações demográficas verificadas na altura, aos desenvolvimentos tecnológicos, levando a alterações na alimentação e a uma globalização da indústria alimentar. Com um comércio cada vez mais internacionalizado, e com o crescimento da exigência, por parte dos consumidores, em relação à qualidade dos alimentos que ingeriam, surgiu uma maior preocupação e atenção relativamente à indústria alimentar.

À época, os microbiólogos que estudavam o desenvolvimento microbiano nos alimentos depararam-se, também, com o facto de que os métodos de microbiologia tradicionais, e até os chamados "métodos rápidos", para determinarem a qualidade e a segurança de determinado género alimentício, estavam limitados pelo tempo necessário para a obtenção de resultados e pela pouca previsibilidade que estes permitiam.

Deste modo, o aumento de doenças e a incapacidade dos métodos, juntamente com o desenvolvimento tecnológico dos computadores e o acesso aos mesmos, vieram possibilitar que fossem dados os derradeiros passos para o início da Microbiologia Preditiva [2, 3].

Podem-se considerar dois possíveis cenários distintos para o surgimento da Microbiologia Preditiva. O primeiro terá sido no controlo dos resíduos provenientes da indústria piscatória, no Reino Unido, com a publicação de um modelo que relacionava o efeito da temperatura com o aumento do crescimento microbiano e, consequentemente, da deterioração do peixe, no ano de 1964, por Spencer e Baines. Essa primeira relação entre o crescimento microbiano e factores extrínsecos, neste caso a temperatura, atraiu a atenção de muitos investigadores e permitiu verificar similaridades entre o processo de deterioração do peixe com outras indústrias, levando à criação de modelos semelhantes para, por exemplo, resíduos de aves e deterioração dos produtos derivados [3].

O segundo cenário, que poderá ter estado na origem da Microbiologia Preditiva, terá sido na investigação sobre prevenção e combate ao botulismo e outras intoxicações microbianas, quando, na Universidade da Califórnia, um grupo de investigadores combinaram diversos factores de forma a prevenir o crescimento dos microrganismos patogénicos e a formação de toxinas. Os modelos daí resultantes terão sido dos primeiros a relacionar factores intrínsecos e extrínsecos com o crescimento microbiano, factores como temperatura, pH e concentração salina [3].

Desde essa altura, a Microbiologia Preditiva tem evoluído, e tem vindo a relacionar novos factores ao crescimento microbiano (actividade da água (a_w), por exemplo) graças a um grande número de investigações e artigos publicados. No entanto, a aceitação desta nova ciência não foi imediata. Terão sido necessários entre 30 a 40 anos, pois foi vista, durante muito tempo, como uma actividade exclusiva dos investigadores, até aos dias de hoje, onde as suas ferramentas já são consideradas por muitos como peças importantes em diversas actividades, essencialmente na indústria alimentar, dando um enorme auxílio na avaliação de riscos, implementação de HACCP e determinações de prazos de validade [2, 3].

1.2 Factores Intrínsecos e Extrínsecos

Como referido anteriormente, as premissas que os microrganismos não conseguem "pensar", que respondem aos estímulos ambientais para crescerem e se desenvolverem, e que, conhecendo os factores em que determinado microrganismo se encontra, se torna possível prever o seu comportamento e a velocidade de crescimento, são a base que sustenta a Microbiologia Preditiva.

De uma forma geral, nos alimentos, os factores que mais influenciam o crescimento microbiano são a temperatura, o pH e o a_w.

A temperatura é um factor extrínseco ao alimento mas tem uma grande influência no crescimento e na inactivação dos microrganismos patogénicos neste. De uma forma geral, a temperaturas inferiores a 5°C, a replicação dos microrganismos é estabilizada e a deterioração dos géneros alimentícios retardada. Por sua vez, temperaturas superiores a 54°C são, normalmente, letais para a maioria dos microrganismos. No entanto, existem microrganismos cuja temperatura óptima fica fora destes valores, sendo estes os Psicrófilos (temperatura óptima $\leq 15^{\circ}\text{C}$) e os Termófilos (temperatura óptima $\geq 40^{\circ}\text{C}$), que incluem ainda os Hipertermófilos (temperatura óptima $\geq 80^{\circ}\text{C}$).

O pH de um alimento pode determinar a sua capacidade de inibição do crescimento microbiano, uma vez que um ambiente ácido pode conduzir à morte da maioria dos patogénios. Assim, tendo em conta esta inibição, é prática comum adicionar ácidos aos alimentos, como ácido láctico, ácido sórbico ou ácido cítrico, por exemplo. Tal como na temperatura, existem também espécies de microrganismos que têm preferência por ambientes de excepção, como é o caso dos Acidófilos (ambientes com $\text{pH} \leq 5$) e Alcalófilos (ambientes com $\text{pH} \geq 9$).

A actividade da água, a_w, corresponde à água disponível para sustentar o crescimento microbiológico. Esta pode variar entre 0 e 1, sendo que acima de 0,85 encontram-se os alimentos mais susceptíveis de deterioração por microrganismos. No entanto, muitos fungos conseguem sobreviver e colonizar ambientes com valor de a_w inferiores. A adição de sal é muitas vezes utilizada como forma de diminuir a quantidade de água disponível no alimento. Mas, devem ser tidos em conta os microrganismos Halófilos e os Halotolerantes, que sobrevivem em ambientes com altas concentrações de sal, necessitando destas para se desenvolverem, no caso dos Halófilos.

No entanto, quando se fala em alimentos processados terá de se ter em conta outros factores, como, por exemplo, ácidos orgânicos, nitritos, gases atmosféricos, componentes derivados de fumaça, etc.

É assim possível verificar que, para a Microbiologia Preditiva, desde que as necessidades nutricionais básicas sejam atingidas e que nenhum dos nutrientes seja limitante para o crescimento microbiano, a natureza do alimento tem uma importância diminuta, quando comparada com a

importância das propriedades físico-químicas do meio onde este mesmo alimento se encontra inserido [13-15].

1.3 Modelos de Microbiologia Preditiva

Os modelos de Microbiologia Preditiva podem ser definidos como "uma expressão matemática que descreve o crescimento, sobrevivência, inactivação ou processo bioquímico de um dado microrganismo" [4].

Estes são criados com base em medições/observações da alteração do número de unidades formadoras de colónias ao longo do tempo em função das condições ambientais, e cujos dados são obtidos a partir de estudos específicos publicados, de bases de dados disponíveis ou de estudos de crescimentos em alimentos ou em meios de cultura.

Os dados são analisados e são identificados padrões de resposta. Estes são expressos sob a forma de expressões matemáticas com base nos melhores parâmetros que definam as características de determinado microrganismo. A performance do modelo delineado é testada e avaliada, e, se necessário, procedem-se a correcções do modelo ou à construção de um novo modelo. Quando se obtém o modelo final, a equação é inserida em *software* especializado e é disponibilizada para a comunidade [4, 14].

Em 1993, Whiting e Buchanan dividiram os modelos em três classes: primários, secundários e terciários; e até hoje ainda podem ser classificados deste modo [2, 4].

Os modelos primários descrevem a forma como as densidades populacionais dos microrganismos se alteram com o tempo, num ambiente específico, e são retratados sob a forma de curvas de crescimento microbiano, desenvolvidas em programas especializados para fazer corresponder a melhor curva possível com os dados fornecidos.

Os modelos secundários fornecem informação sobre a forma como os parâmetros dos modelos primários sofrem alterações com os factores ambientais e abrangem uma transformação dos tempos de resposta, ou seja, estes prevêm as alterações dos parâmetros primários em função do ambiente. Um exemplo de modelo secundário é a previsão de crescimento microbiano em função da temperatura, ou de um outro factor (extrínseco ou intrínseco).

Os modelos terciários correspondem aos programas, aos diferentes *softwares* disponíveis, e à inserção dos modelos secundários nestes programas [2, 4, 13].

A tabela seguinte, adaptada de [4], permite verificar alguns modelos e a classificação dos mesmos.

Tabela 1.1 - Classificação de alguns modelos de Microbiologia Preditiva (adaptado de [4])

Modelos Primários	Modelos Secundários	Modelos Terciários
Função Gompertz Função Modificada de Gompertz Modelo Logístico Modelo Baranyi Modelo Monod Modelo Monod Modificado Valores D de inactivação térmica Modelo de Decréscimo de Crescimento de Whiting e Cygnarowicz Modelo linear de três fases	Modelo Belehradek Modelo Ratkowsky Modelo Arrhenius Modelos Modificados de Arrhenius Modelos Probabilísticos Valores Z Polinomiais ou resposta Modelos de Superfície Modelo Williams-Landel Ferry	USDA <i>Pathogen Modeling Program</i> <i>Food MicroModel</i> <i>Pseudomonas Predictor</i> <i>Expert Systems</i> <i>ComBase</i>

1.4 Fases de crescimento microbiológico

Para estudar o comportamento e crescimento das populações microbianas, recorre-se, geralmente, a gráficos cujas curvas são conhecidas como curvas de crescimento microbiano. A Microbiologia Preditiva não é excepção, logo, torna-se necessário conhecer as curvas de crescimento microbiano e identificar as distintas fases possíveis dentro das mesmas, para poder interpretar os resultados provenientes das ferramentas a utilizar [13]:

➤ Fase de latência, ou fase *lag*, pode definir-se como o tempo necessário para um determinado microrganismo se adaptar ao novo meio onde se encontra. Ao ser exposto a um novo meio, o microrganismo tem de efectuar mudanças a nível celular que lhe possam permitir crescer neste novo ambiente, como por exemplo a síntese de novas enzimas. Esta fase é a mais imprevisível de todas, uma vez que a adaptação do microrganismo depende da composição do novo meio, como, por exemplo, um novo ambiente contendo um nutriente essencial de difícil metabolização ou presença de condições de grande *stress* a que o microrganismo não está habituado, podem levar a fases de latência bastante longas.

➤ Fase exponencial representa, basicamente, a replicação dos microrganismos. Após a adaptação ao novo meio, as células iniciam o seu crescimento e replicação. Ocorre um primeiro pico de aceleração na taxa de crescimento, que rapidamente se torna constante. Nesta fase, os nutrientes estão presentes em excesso no meio e a população microbiana cresce a uma taxa específica de crescimento máximo, dependente do potencial genético do microrganismo, da composição do novo meio e das condições de crescimento permitidas pelos factores intrínsecos e extrínsecos.

➤ Fase estacionária corresponde ao nível máximo que um microrganismo consegue atingir no seu crescimento. Esta fase ocorre quando se dá o esgotamento de um nutriente essencial, acumulação de produtos inibidores do metabolismo e/ou a presença de outros microrganismos competidores, que fazem com que o crescimento e replicação microbiana estagne. No entanto, os microrganismos podem manter-se viáveis por períodos de tempo mais ou menos longos.

➤ Fase de morte caracteriza-se pela perda irreversível da capacidade de replicação por parte dos microrganismos, levando à morte celular, reflectindo-se num declínio da concentração de células viáveis na população ao longo do tempo. A observação desta fase não é muito comum nos géneros alimentícios, mas pode ocorrer após um longo período de armazenamento.

A figura 1.1 representa o padrão típico de uma curva de crescimento, com as respectivas fases.

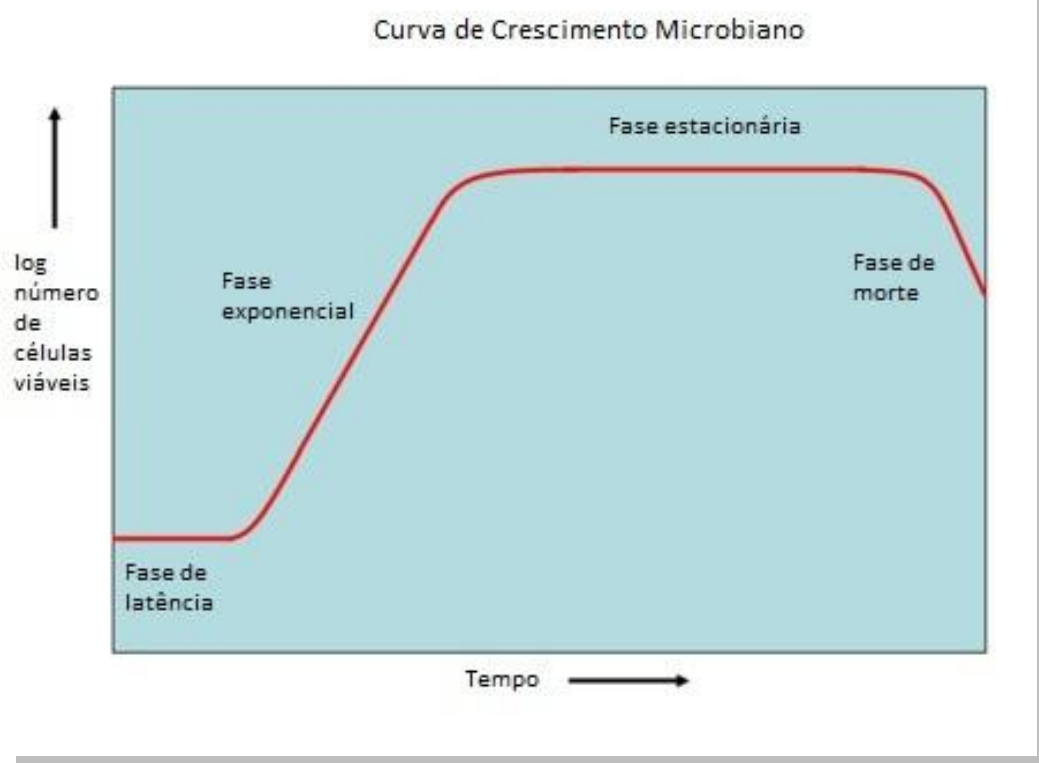


Figura 1.1 - Padrão típico de uma curva de crescimento microbiano (adaptado de [16])

1.5 Usos e limitações

Como qualquer área científica e técnica, a Microbiologia Preditiva tem várias aplicações, mas também apresenta algumas limitações.

Permite-nos obter previsões relativas ao crescimento microbiano ao longo do tempo, à diminuição, inactivação e morte de populações microbianas, e permite prever a probabilidade de crescimento microbiano associado à possível produção de toxinas, essencial para determinar a estabilidade dos géneros alimentícios.

Em termos de utilização, a Microbiologia Preditiva possibilita-nos ter uma acção *reactiva* ou uma reacção *proactiva* em relação aos problemas que possam surgir.

Relativamente à acção reactiva, em que se actua consoante a análise que é feita com a informação que está disponível na altura, a Microbiologia Preditiva possibilita, por exemplo, a identificação de pontos de controlo críticos (no caso do HACCP), avaliação das implicações para a segurança alimentar no caso de uma perda de "controlo" do processo, avaliar equivalências entre diferentes processos ou a toma de decisões de análise de risco e gestão do risco.

Uma identificação do que existe e a decisão do que fazer em relação à situação que se conhece corresponde à acção proactiva da Microbiologia Preditiva. Por exemplo, no caso da delineação de processos e produtos com vista a irem corresponder aos objectivos de qualidade e segurança a que uma empresa se propõe, tentando diminuir ao máximo possíveis erros futuros, e no caso de inovação nos produtos e, consequentemente, na empresa.

As maiores limitações que se apresentam à Microbiologia Preditiva são derivadas, essencialmente, dos próprios modelos em si. Os modelos utilizados não permitem saber se o microrganismo em questão está mesmo presente no alimento, uma vez que se assume que estará, não permitem conhecer a densidade microbiana que estaria presente no início. Estes modelos, geralmente, também não indicam os níveis de confiança que o utilizador deve ter em consideração quando analisa os resultados, nem costumam indicar os limites impostos à sua utilização.

Estes modelos também não consideram as diferentes estirpes de microrganismos, apesar de haver consideráveis diferenças entre estirpes de alguns patogénios (diferenças entre estirpes de *E. coli*, por exemplo) e também não assumem a possibilidade de existirem pequenos micro-ambientes à volta dos microrganismos, que propiciam um desenvolvimento microbiano diferente ao que está a ser considerado. Estes problemas devem-se, principalmente, à falta de dados relevantes que permitam uma previsão mais acertada.

No entanto, apesar de algumas limitações, em muitas situações torna-se possível verificar um correcto funcionamento dos modelos, como é o caso de sistemas definidos e controlados, com poucas variáveis, e prever os efeitos relativos a mudanças nessas variáveis [14].

De outro modo, se os benefícios não suplantassem as limitações, a Microbiologia Preditiva não seria amplamente utilizada como se verifica hoje em dia, tanto na investigação, como na indústria alimentar, com o objectivo de determinar prazos de validade, no auxílio à delineação de protocolos de segurança, implementações de HACCP e avaliação de risco.

1.6 Futuro da Microbiologia Preditiva

Após cerca de 4 décadas de constantes desenvolvimentos, os investigadores começam a olhar para a Microbiologia Preditiva com outros olhos, tentando maximizar as suas capacidades. Novas tecnologias estão a ser pensadas para facilitarem os processos industriais, mas, também, para facilitarem a fase "pós-indústria", ou seja, os retalhistas e o consumidor final. Como, por exemplo, os chamados "relatórios em tempo real" [12].

É o caso de um adesivo que está a ser criado, que se aplica no código de barras do produto, que regista variações de temperatura e a data de validade do produto. Assim, quando o produto passa a data de validade, este adesivo torna-se opaco e impossibilita a leitura do código de barras e a consequente venda do produto. O mesmo se verifica quando o produto sofreu várias alterações térmicas durante o transporte, que possam ter comprometido a qualidade e segurança do mesmo, estas são detectadas pelo adesivo, tornando-se então opaco.

Um outro exemplo, corresponde a um outro adesivo que, ao chegar o final da data de validade, muda de cor, de verde para vermelho. Esta mudança ocorre rapidamente e poucas horas antes do fim da data.

É sabido que poucos consumidores tomam a atenção devida às datas de validade dos produtos que consomem, muitos devido à falta de tempo na altura de aquisição destes bens. Estes dois exemplos de "relatórios em tempo real" tornam a informação mais visível para os consumidores, e possibilitam, a estes, tomarem decisões mais correctas nas suas compras, diminuindo o risco de problemas de qualidade e segurança alimentar [12].

Por outro lado, a Microbiologia Preditiva começa a ser vista, também, para além da vertente Alimentar.

Um novo campo, denominado de Biologia de Sistemas, tem tentado utilizar as ferramentas de Microbiologia Preditiva de forma a incluir novos parâmetros na análise, como estados de energia e

termodinâmica de reacções enzimáticas que ocorrem no interior das células. O objectivo principal dos investigadores, neste novo campo, é descrever o comportamento das células na fase de latência, entendendo os processos fisiológicos que determinem o início e, especialmente, o fim desta fase, na tentativa de prever os rácios de crescimento subsequentes. A Biologia de Sistemas pretende, assim, ajudar a Microbiologia Preditiva a possuir modelos preditivos mais seguros, confiáveis e menos sujeitos a erros, e que permitam a existência de ferramentas com maior competência, capazes de actuar com pequenas variações nos parâmetros e com um diminuto número de microrganismos iniciais. Este campo vai no sentido de fortalecer e dar maior robustez à Microbiologia Preditiva, com modelos e ferramentas que funcionem tão bem em laboratório como fora deste [17].

Existem outras aplicações para a Microbiologia Preditiva. Muitos investigadores da microbiologia ambiental mostram-se interessados nesta nova vertente, devido, em grande parte, ao facto de existir uma enorme percentagem de microrganismos na natureza cuja cultura seja bastante difícil de manter, ou mesmo impossível. Muitos ambientes estão sujeitos a grandes alterações no que respeita a factores, tais como temperatura ou salinidade, que são muito difíceis de simular em laboratório. Assim, os investigadores começam a olhar para a Microbiologia Preditiva como uma forma de conhecer esses, e outros, microrganismos presentes na natureza, descrevendo o seu papel nos ecossistemas correspondentes, e desenvolvendo novas teorias, modelos e tecnologias inovadoras. Acredita-se que esta simbiose entre as duas áreas pode beneficiar a Microbiologia no seu todo, permitindo descobrir e entender um pouco melhor os diferentes ecossistemas microbianos [12].

Capítulo 2 - Ferramentas de Microbiologia Preditiva

2.1 Programas utilizados na Microbiologia Preditiva

Como referido, existe uma série de ferramentas (*software*) dentro da área da Microbiologia Preditiva. É possível encontrar na literatura uma série de programas "caseiros", que são basicamente equações aplicadas a processadores matemáticos (Microsoft® Excel, Mathlab® ...). No entanto, estão disponíveis na internet uma boa selecção de programas, muitos deles de acesso livre, que são óptimas ferramentas de trabalho. A tabela seguinte enuncia alguns dos programas mais conhecidos e utilizados pelos investigadores.

Tabela 2.1 - Programas informáticos associados à Microbiologia Preditiva, disponíveis na internet (adaptado de [1, 14])

<i>ComBase</i>	ComBase Consortium, Food Standards Agency, Institute of Food Research, USDA ARS ERRC http://www.combase.cc/
<i>Pathogen Modeling Program</i>	USDA ARS Eastern Regional Research Center (ERRC) http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx
<i>Seafood Spoilage Predictor</i>	Danish Institute for Fisheries Research Microbiology Group http://sssp.dtuqua.dk/
<i>Growth Predictor</i>	Web-based version of Perfringens Predictor is now included in the <i>Combase Modelling Toolbox</i> http://www.ifr.ac.uk/Safety/GrowthPredictor/
<i>THERM</i>	The University of Wisconsin Center for Meat Process Validation http://www.meathaccp.wisc.edu/THERM/Calc.aspx
<i>Bacanova Project</i>	European Commission Frame V Programme http://www.ifr.ac.uk/bacanova/default.html
<i>Refrigeration Index</i>	Meat and Livestock Australia http://www.mla.com.au
<i>Sym'Previus</i>	An integrated database and predictive software, in French www.symprevius.net

Neste trabalho, irão ser utilizados, para atingir o objectivo proposto, os programas *ComBase* e *Pathogen Modeling Program* (PMP), as duas ferramentas com maior expressão dentro da Microbiologia Preditiva.

2.2 ComBase

A *ComBase* será, talvez, a base de dados mais referenciada na área da Microbiologia Preditiva. Esta é uma enorme base de dados, com mais de 40700 registos sobre crescimento e sobrevivência de microrganismos, patogénicos e não só, e tem tido uma evolução contínua. O acesso a esta ferramenta é livre, tendo apenas de se fazer um registo prévio, unicamente para controlo e estatísticas por parte dos institutos que a coordenam.

Surgiu de um consórcio entre o Institute of Food Research, sediado no Reino Unido, o USDA Agricultural Research Service, nos Estados Unidos, e o Food Safety Centre, na Austrália.

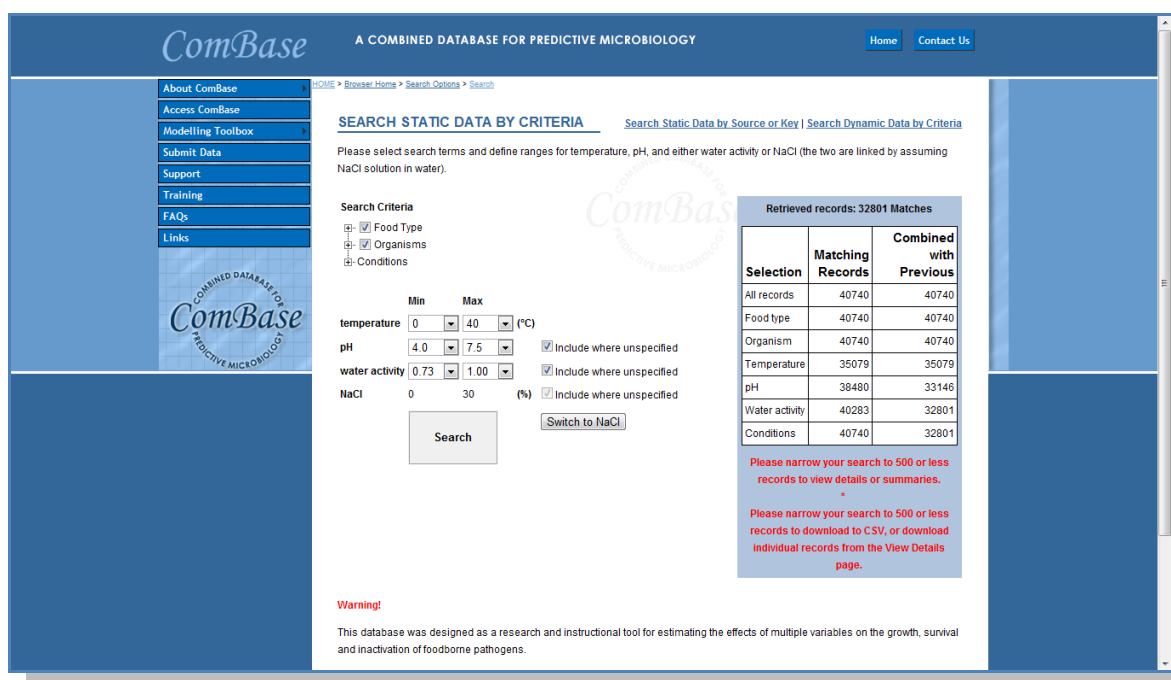
É uma base de dados que vive das colaborações dos investigadores e, a qualquer momento, estes podem adicionar novos dados, ajudando a *ComBase* a crescer.



Figura 2.1 - Página inicial da *ComBase* [18].

Está dividido entre *ComBase Browser* e *ComBase Predictor*.

O primeiro, *ComBase Browser*, recorre às bases de dados e curvas de crescimento obtidas a partir de dados divulgados em artigos científicos e/ou por institutos.



ComBase A COMBINED DATABASE FOR PREDICTIVE MICROBIOLOGY

Home Contact Us

About ComBase Access ComBase Modelling Toolbox Submit Data Support Training FAQs Links

SEARCH STATIC DATA BY CRITERIA Search Static Data by Source or Key | Search Dynamic Data by Criteria

Please select search terms and define ranges for temperature, pH, and either water activity or NaCl (the two are linked by assuming NaCl solution in water).

Search Criteria

- ☒ Food Type
- ☒ Organisms
- ☒ Conditions

temperature Min 0 Max 40 (°C)

pH 4.0 7.5 ☒ Include where unspecified

water activity 0.73 1.00 ☒ Include where unspecified

NaCl 0 30 (%) ☒ Include where unspecified

Switch to NaCl

Search

Retrieved records: 32801 Matches

Selection	Matching Records	Combined with Previous
All records	40740	40740
Food type	40740	40740
Organism	40740	40740
Temperature	35079	35079
pH	38480	33146
Water activity	40283	32801
Conditions	40740	32801

Please narrow your search to 500 or less records to view details or summaries.

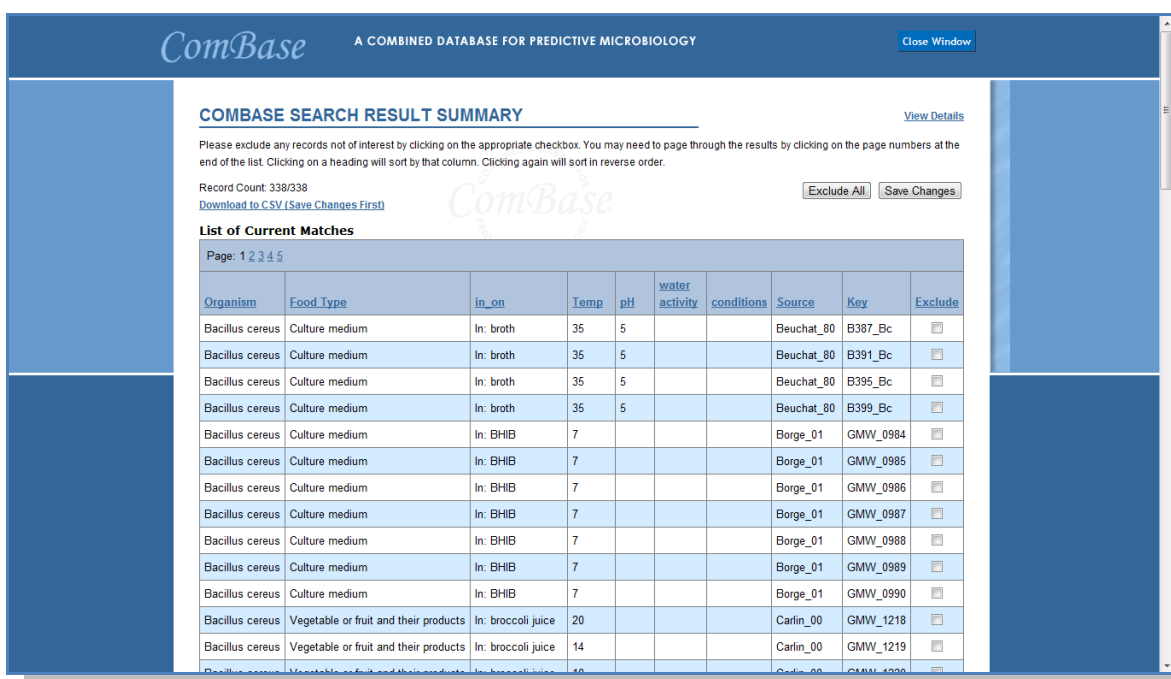
Please narrow your search to 500 or less records to download to CSV, or download individual records from the View Details page.

Warning!

This database was designed as a research and instructional tool for estimating the effects of multiple variables on the growth, survival and inactivation of foodborne pathogens.

Figura 2.2 - Página do *ComBase Browser* [18].

Na página do *ComBase Browser* (Fig. 2.2) torna-se possível filtrar os resultados de acordo com o que é desejado, escolhendo critérios como tipo de alimento, microrganismo, temperatura, pH e actividade de água ou salinidade.



COMBASE SEARCH RESULT SUMMARY View Details

Please exclude any records not of interest by clicking on the appropriate checkbox. You may need to page through the results by clicking on the page numbers at the end of the list. Clicking on a heading will sort by that column. Clicking again will sort in reverse order.

Record Count: 338/338
Download to CSV (Save Changes First)

Exclude All Save Changes

List of Current Matches

Page: 1 2 3 4 5

Organism	Food Type	In_on	Temp	pH	water activity	conditions	Source	Key	Exclude
Bacillus cereus	Culture medium	In: broth	35	5			Beuchat_80	B387_Bc	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Culture medium	In: broth	35	5			Beuchat_80	B391_Bc	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Culture medium	In: broth	35	5			Beuchat_80	B395_Bc	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Culture medium	In: broth	35	5			Beuchat_80	B399_Bc	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Culture medium	In: BHIB	7				Borge_01	GMW_0984	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Culture medium	In: BHIB	7				Borge_01	GMW_0985	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Culture medium	In: BHIB	7				Borge_01	GMW_0986	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Culture medium	In: BHIB	7				Borge_01	GMW_0987	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Culture medium	In: BHIB	7				Borge_01	GMW_0988	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Culture medium	In: BHIB	7				Borge_01	GMW_0989	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Culture medium	In: BHIB	7				Borge_01	GMW_0990	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Vegetable or fruit and their products	In: broccoli juice	20				Carlin_00	GMW_1218	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Vegetable or fruit and their products	In: broccoli juice	14				Carlin_00	GMW_1219	<input type="checkbox"/>
Bacillus cereus	Vegetable or fruit and their products	In: broccoli juice	40				Carlin_00	GMW_1220	<input type="checkbox"/>

Figura 2.3 - Sumário de resultados dentro do *ComBase Browser* [18].

Após a escolha dos critérios desejados, é fornecido um sumário de resultados (Fig. 2.3) e deste pode-se escolher o que mais se aproxima à realidade do que se procura, e ver os detalhes do mesmo (Fig. 2.4). Torna-se possível, também, comparar os resultados com a previsão feita pelo *ComBase Predictor* (Fig. 2.5).

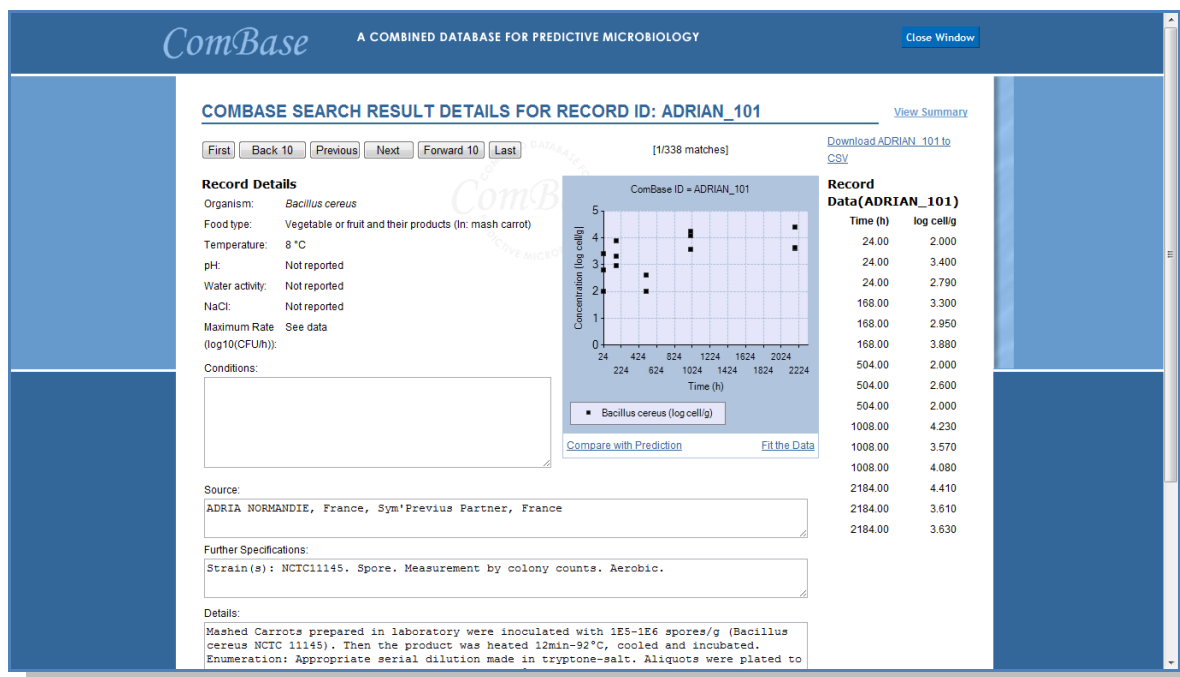


Figura 2.4 - Detalhes de resultados dentro do *ComBase Browser* [18].

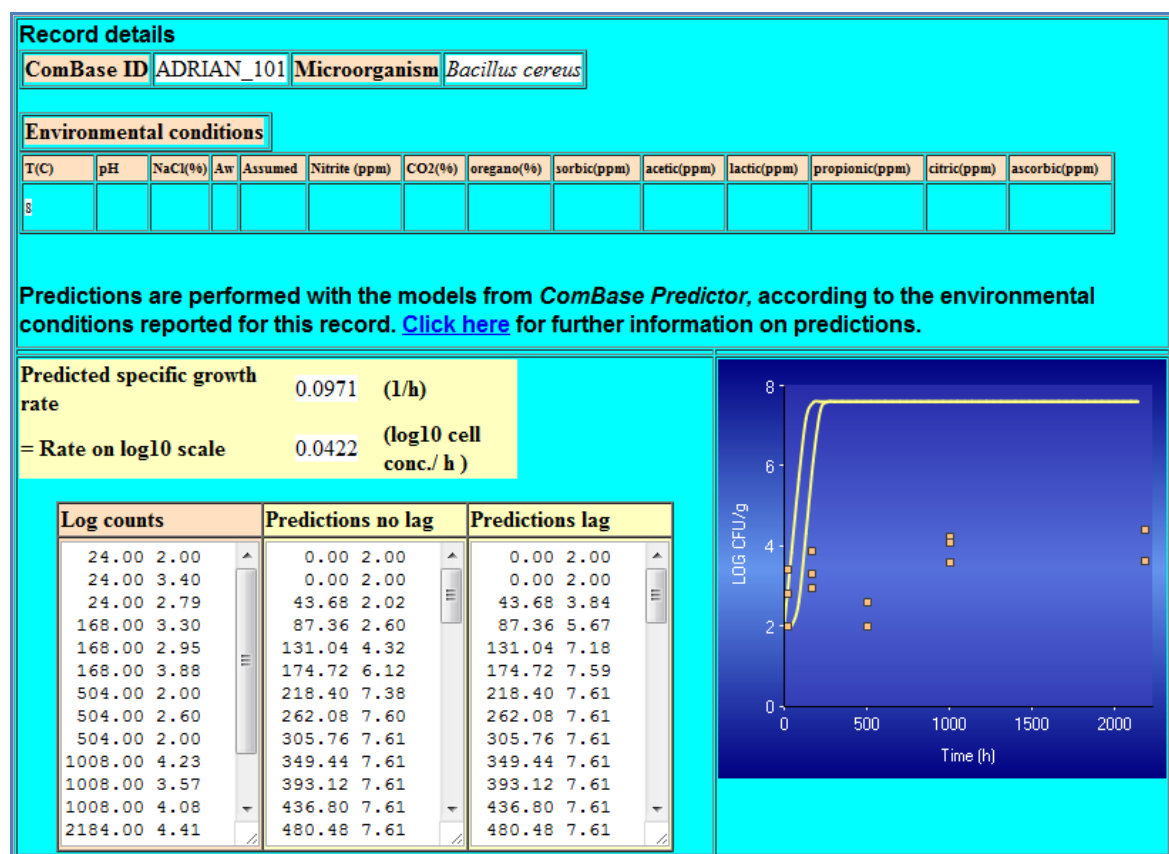


Figura 2.5 - Comparação dos resultados obtidos no *ComBase Browser* com a previsão do *ComBase Predictor* [18].

O *ComBase Predictor*, corresponde à ferramenta de Microbiologia Preditiva, propriamente dita, disponível no site para acesso global.

Após feito o registo necessário, fica disponível uma "caixa de ferramentas" onde se inclui o *Combase Predictor*, o *Perfringens Predictor* (ferramenta para prever o crescimento de *Clostridium perfringens* em carnes e derivados) e o DMFIT (ferramenta que permite ajustar curvas e determinar rácios como crescimento/morte, por exemplo) (Fig. 2.6).

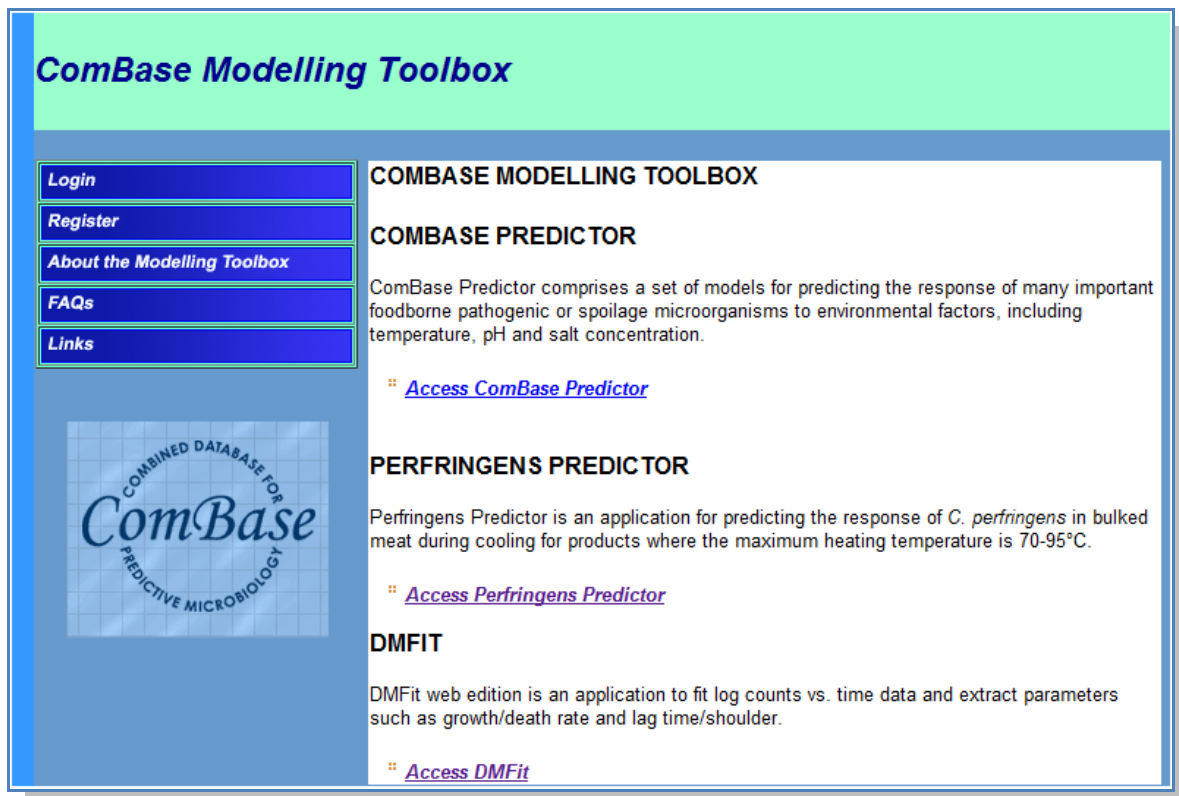


Figura 2.6 - ComBase Modelling Toolbox [18].

Ao entrar na ferramenta *ComBase Predictor* o utilizador depara-se com uma página inicial, de fácil percepção, onde encontra todos os campos necessários para a previsão (Fig. 2.7). Em qualquer caso de dúvidas, está sempre disponível a secção de "ajuda" na parte inferior da página.

ComBase Predictor

☒ Growth model
 ☐ Thermal inactivation model
 ☐ Non thermal survival model

Temperature input
☒ Static
 ☐ Changing temperature

Water activity
☒ NaCl
 ☐ Aw

Observation duration
 Time (h) 23.00

add a row

Aeromonas hydrophila

Initial level	Phys.state[0-1]	T (°C)[2-37]	pH[4.6-7.5]	NaCl (%) [0.0-4.5]	Max.rate (log.conc/h)	Dbl.time (h)
<=7						
3	0.001836		7	0.5	0.44	0.69

remove last row

Predict

Predictions

time(h)	conc. (Log10 cells/g)
0.00	3.00
0.00	3.00
0.46	3.00
0.92	3.00
1.38	3.00
1.84	3.00
2.30	3.01
2.76	3.01
3.22	3.02
3.68	3.03

Log CFU/g

Time (h)

[Other ComBase Modelling Tools](#)
[About ComBase Predictor](#)
[ComBase Predictor Help](#)
[ComBase Predictor FAQs](#)

Figura 2.7 - Página inicial do *ComBase Predictor* [18].

Esta ferramenta permite ainda uma previsão com mais do que um microrganismo ao mesmo tempo, e com factores extrínsecos e intrínsecos diferentes entre eles, ou seja, uma previsão múltipla (Fig. 2.8).

ComBase Predictor

☒ Growth model
☐ Thermal inactivation model
☐ Non thermal survival model

Temperature input

☒ Static
☐ Changing temperature

Water activity

☒ NaCl
☐ Aw

Observation duration

Time (h)

add a row

Escherichia coli with CO2(%)

Initial level <=7

Phys.state [0-1]

T (°C) [10-42]

pH [4.5-7.5]

NaCl (%) [0.0-6.5]

CO2(%) [0-100]

Max.rate (log.conc/h)

Dbl.time (h)

3

0.165299 [Help](#)

25

7

0.5

0

0.51

0.59

Bacillus cereus with CO2(%)

Initial level <=7

Phys.state [0-1]

T (°C) [5-34]

pH [4.9-7.4]

NaCl (%) [0.0-9.4]

CO2(%) [0-60]

Max.rate (log.conc/h)

Dbl.time (h)

3

0.000811 [Help](#)

34

7

0.5

0

1.59

0.19

Staphylococcus aureus

Initial level <=7

Phys.state [0-1]

T (°C) [7.5-30]

pH [4.4-7.1]

NaCl (%) [0.0-13.5]

Max.rate (log.conc/h)

Dbl.time (h)

3

0.045049 [Help](#)

20

7

0.5

0.18

1.69

remove last row

Predict

Predictions

time(h)	conc. (Log10 cells/g)		
0.00	3.00	3.00	3.00
0.00	3.00	3.00	3.00
0.46	3.05	3.00	3.00
0.92	3.12	3.01	3.01
1.38	3.22	3.04	3.01
1.84	3.36	3.18	3.02
2.30	3.52	3.58	3.03
2.76	3.71	4.21	3.04
3.22	3.91	4.92	3.05
3.68	4.13	5.64	3.06

[Other ComBase Modelling Tools](#)
[About ComBase Predictor](#)
[ComBase Predictor Help](#)
[ComBase Predictor FAQs](#)

Figura 2.8 - Previsão múltipla, utilizando *ComBase Predictor* [18].

Para além de modelos de crescimento, esta ferramenta também dispõe de modelos de inactivação térmica e modelos de sobrevivência, bastando para isso alterar o modelo desejado na parte superior da página.

2.3 Pathogen Modeling Program

A ferramenta denominada de Pathogen Modeling Program (PMP) é, também, uma das mais referenciadas e utilizadas pelos investigadores na área da Microbiologia Preditiva. Pertence ao Department of Agriculture - Agricultural Research Service (USDA-ARS), nos Estados Unidos, e é mantido pelo Eastern Regional Research Center, no estado americano da Pennsylvania.

Esta ferramenta é composta por um pacote de modelos preditivos de crescimento e inactivação de microrganismos, que desde os inícios da década de 90, do século XX, tem vindo a ser constantemente actualizada, começando por pequenas folhas de cálculo até dispor de um *software* próprio.

Tem como principal objectivo auxiliar tanto a indústria como as instituições académicas e científicas, num melhor entendimento da Microbiologia Preditiva e promover um crescente uso destas técnicas.

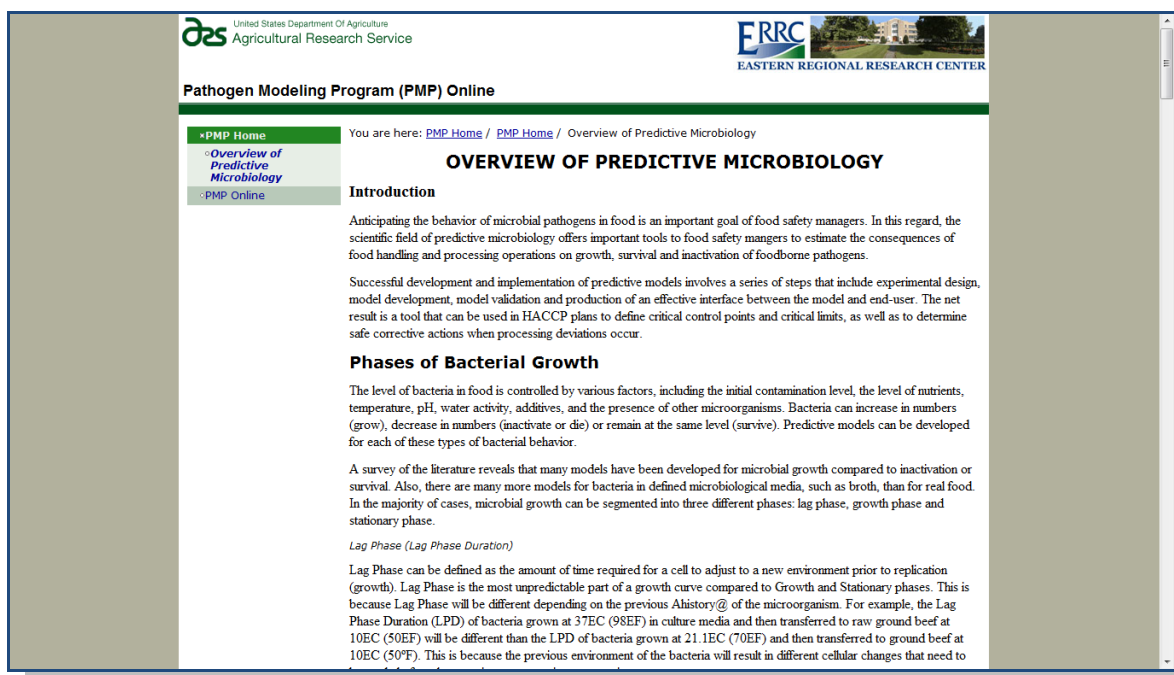


Figura 2.9 - Página inicial do PMP [19].

Na página inicial do site do PMP encontra-se um breve resumo e explicação do que é a Microbiologia Preditiva (Fig. 2.9). A partir desta página é possível aceder ao PMP Online, onde se encontra a fase inicial da ferramenta, a escolha dos modelos a utilizar (Fig. 2.10).

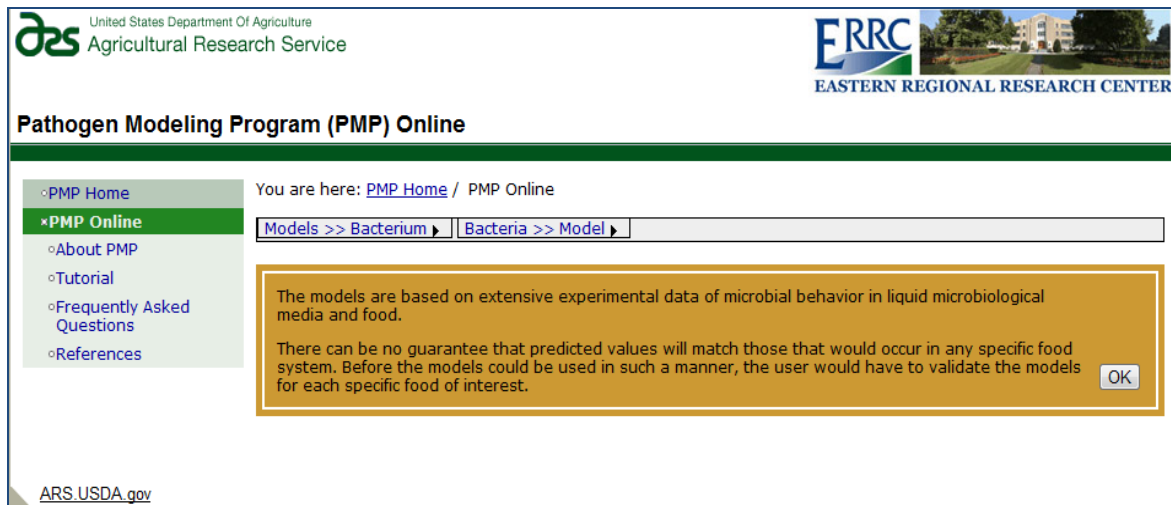


Figura 2.10 - PMP Online [19].

A escolha do modelo preditivo que se pretende usar pode ser feita através da escolha dos tipos de modelo (Fig. 2.11) ou a partir da espécie de microrganismo que se pretende estudar e dos modelos que estão disponíveis para a respectiva espécie (Fig. 2.12).

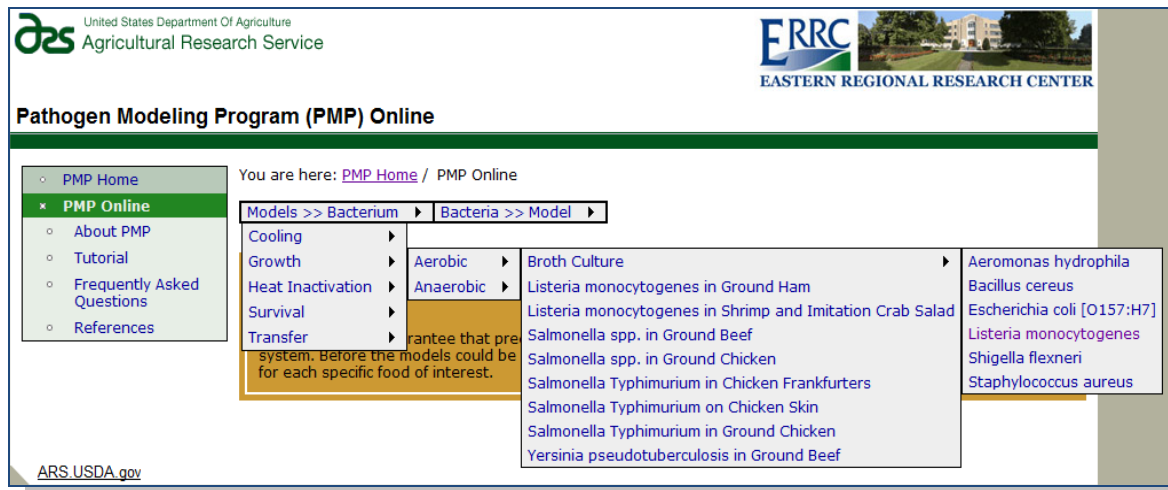


Figura 2.11 - Escolha dos modelos preditivos, a partir do tipo de modelo [19].

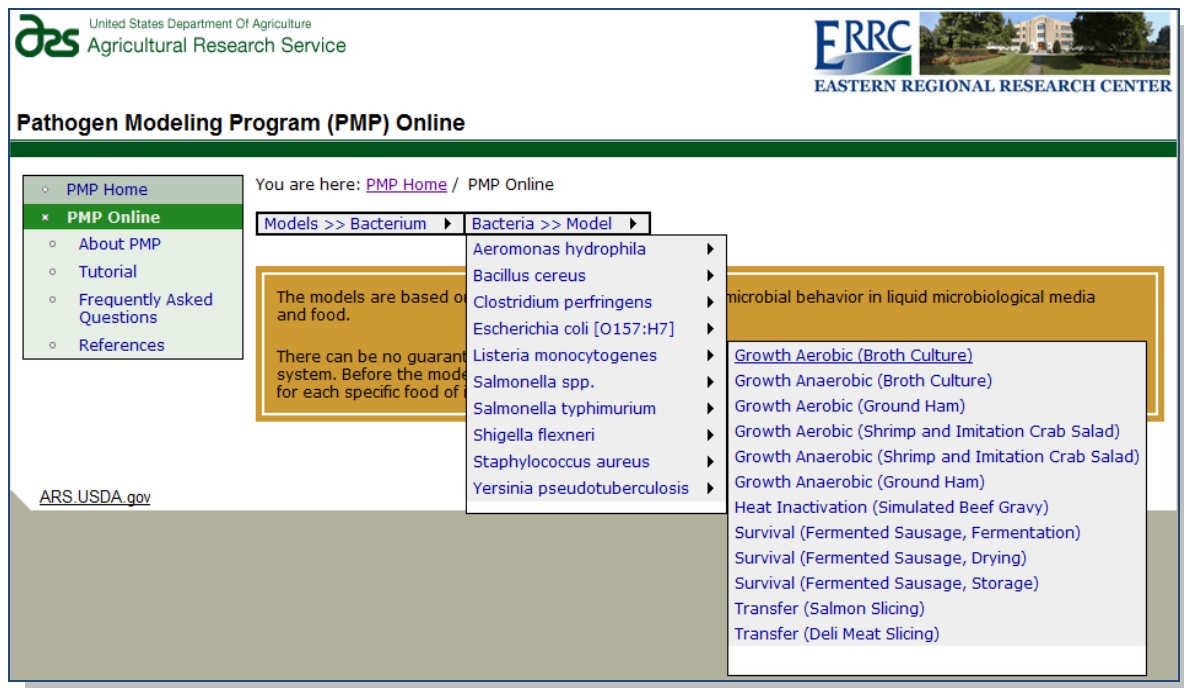


Figura 2.12 - Escolha dos modelos preditivos, a partir da espécie de microrganismos [19].

Após a escolha do modelo pretendido, é fornecida uma página, onde se colocam as condições do meio, factores intrínsecos e extrínsecos. Os resultados são apresentados sob a forma de gráficos, sendo que aparecem dois gráficos (com e sem fase de latência), uma tabela com os parâmetros do modelo escolhido, uma outra tabela com as referências de onde a informação foi obtida, e, do lado direito, encontra-se uma tabela descritiva com todos os valores de número de células por cada fracção de tempo (Fig. 2.13).

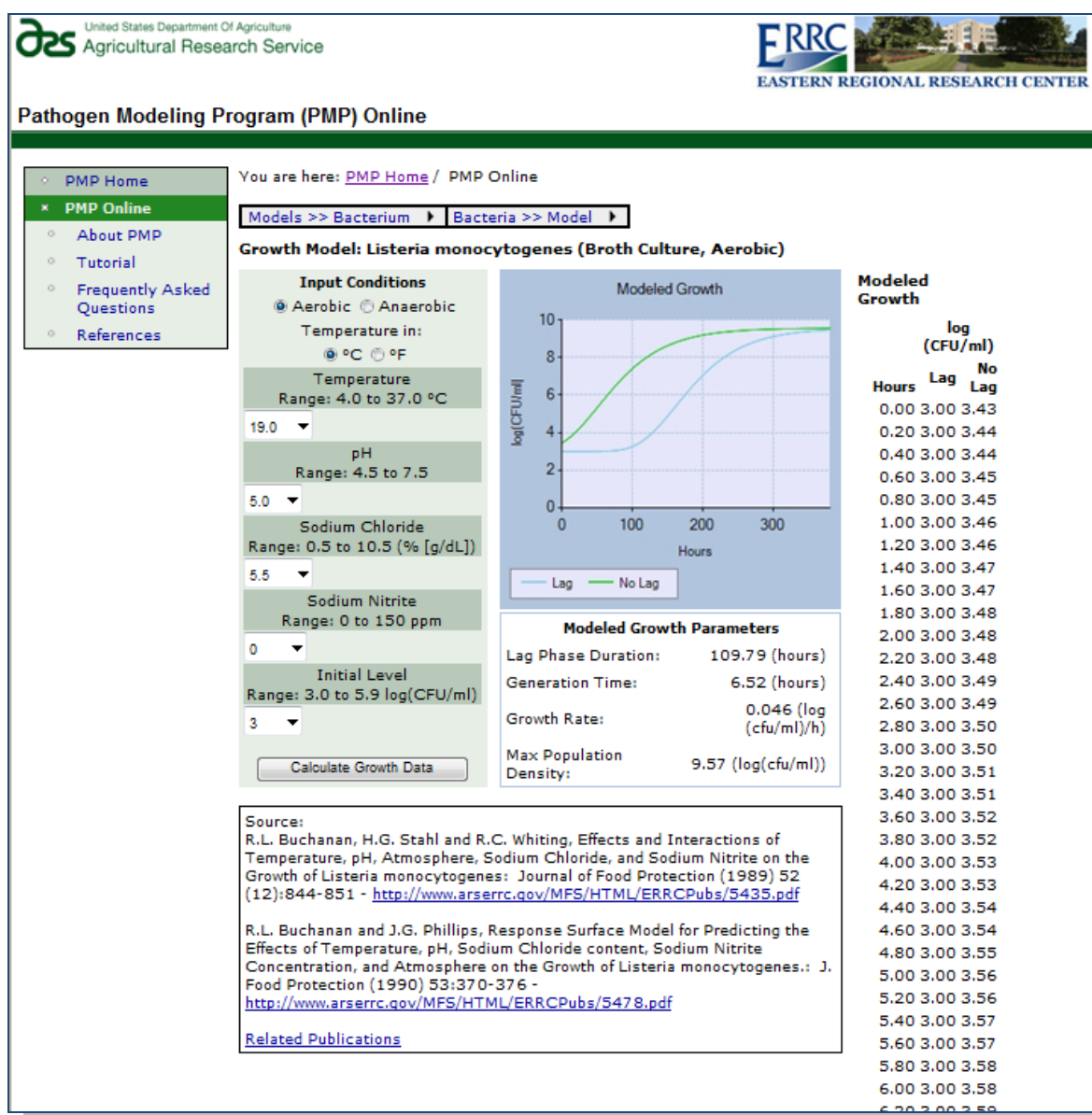


Figura 2.13 - Apresentação de resultados de previsão pelo PMP Online [19].

Uma das principais limitações deste programa é o facto de abranger uma classe de alimentos muito reduzida (essencialmente carnes e derivados).

Outras limitações deste programa que podem interferir com a veracidade das previsões são o facto de só permitir um mínimo de salinidade de 0,5% e de assumir um inóculo inicial de 10^3 UFC/gr, para qualquer produto.

Capítulo 3 - Caso de Estudo

3.1 A empresa

De forma a não ir de encontro com algum tipo de direitos, a empresa em estudo será denominada por "ENF - Empresa de Nome Fictício, S.A." e será referida, daqui em diante, por "ENF" ou "empresa".

A ENF está sediada no distrito de Setúbal, Portugal, e está, desde 2006, incluída num grupo multinacional, cotado como um dos três maiores líderes do mercado da pastelaria, a nível europeu. Este grupo faz uma grande aposta em desenvolvimento, produção e comercialização de géneros alimentícios nos segmentos de pastelaria, *food service*, geladaria e indústria. Tem um extenso espólio de produtos desde bolos, cremes, gelados, aromas, geleias, chocolates até a simples decorações.

O grupo, tem como principais pontos de crescimento a constante procura pelo conhecimento, criatividade e inovação.

Em termos de qualidade e segurança, todas as empresas do grupo estão em conformidade com a ISO 9001:2008 e o sistema de HACCP. Todos os produtos são geridos desde que entram nas instalações até chegarem ao cliente, sendo garantida uma rastreabilidade, que permite uma oferta de produtos de maior qualidade e segurança. A ENF está, também, certificada de acordo com o referencial BRC, tendo obtido, em 2010, o grau A.

Em Portugal, a empresa tem sectores de produção, venda e apoio ao cliente, qualidade e investigação e desenvolvimento (I&D). É nestes dois últimos sectores que a Microbiologia Preditiva poderá ser mais útil, se forem tomadas em conta muitas das suas possibilidades.

3.2 O produto

A ENF produz preparados para bolos, semi-frios, massas lêvedas, coberturas, açúcar em pó, entre outros. Mas são os cremes de pasteleiro que representam a maior parte do negócio da empresa.

Creme de pasteleiro é o nome dado ao recheio doce que é colocado no interior dos bolos, ou na parte superior, no caso de tartes, por exemplo.

Na empresa, os cremes pasteleiro são produzidos em três tipos diferentes: preparado em pó para elaboração a frio, preparado em pó para elaboração a quente e recheios líquidos prontos a utilizar.

- Cremes a frio (CF), são preparados em pó, em que o cliente só tem de adicionar água, e por vezes açúcar, e bater a mistura para obter o creme de pasteleiro, que pode ser consumido imediatamente a seguir. É denominado "a frio" pois, ao contrário do que normalmente se utiliza nas pastelarias, a água adicionada pode ser à temperatura ambiente, sem necessitar de aquecimento prévio (podendo ser aquecida, se o cliente assim o desejar). A gama deste produto é muito extensa e variada, havendo diferentes cores, texturas e sabores, de acordo com o gosto do cliente.
- Cremes a quente (CQ), são, também, preparados em pó, onde se tem de adicionar água previamente aquecida, e por vezes açúcar, e bater a mistura de forma a obter o creme de pasteleiro. Por razões óbvias, este não pode ser consumido logo de seguida, pois tem de arrefecer. A ENF também tem algumas opções diferentes, dentro desta gama de produtos, com cor, sabor e texturas diferentes entre si.
- Recheios líquidos (RL), são cremes pasteleiros prontos a utilizar. Como o próprio nome indica, o produto final está sob a forma líquida/viscosa, e a sua aplicação não precisa de qualquer tipo de adição de água ou açúcar, podendo ser colocada directamente no bolo (ou tarte ou semi-frio...). Existe, também, uma gama variada dentro deste tipo de produtos. Torna-se necessária uma linha de produção diferente para este produto, pois a fabricação é distinta dos produtos em pó. Posteriormente à sua produção, estes são embalados a vácuo e procede-se à sua pasteurização.

Os dois primeiros são vendidos sob a forma de pó, em sacos que podem ir de 5 a 25kg, enquanto os últimos são vendidos sob a forma líquida, em baldes ou jerricans de 1 a 15kg.

Para o estudo, irão ser considerados os cinco produtos mais vendidos dentro de cada classe de produtos, pó e líquidos. Juntos, a venda destes dez produtos consumiu mais de oitocentos toneladas, no ano de 2010. As seguintes tabelas apresentam os valores, em kilogramas, dos cinco produtos mais vendidos, em 2010, dentro de cada classe de cremes.

Tabela 3.1 - Vendas do ano de 2010, para o TOP 5 de Cremes em Pó (CF e CQ)

NOME	QUANTIDADE (KG)
CF1	215080
CF2	113340
CF3	66525
CQ1	29892
CQ2	27720

Tabela 3.2 - Vendas do ano de 2010, para o TOP 5 de Recheios Líquidos (RL)

NOME	QUANTIDADE (KG)
RL1	176000
RL2	130560
RL3	81080
RL4	11947
RL5	11724

Assim, torna-se possível verificar e ter a percepção da importância dos processos de qualidade e segurança alimentar deste tipo de produtos para a ENF, na sua economia e no seu crescimento.

3.3 Parâmetros microbiológicos

A empresa tem estipulados limites microbiológicos para todos os seus produtos. Uma vez que não existe legislação específica para esta indústria, para estabelecer limites para os cremes em estudo a empresa baseia-se no Regulamento (CE) n.º 852/2004, Regulamento (CE) n.º 2073/2005 e o Decreto-Lei n.º 41/2009, para além das características das diferentes matérias-primas utilizadas, experiência, histórico de resultados e aplicação final de cada produto. Para os cremes em estudo, estes limites são:

- ❖ Contagem total: máximo 50 000 UFC/g
- ❖ Coliformes: máximo 1 000 UFC/g
- ❖ *Escherichia coli*: máximo 10 UFC/g
- ❖ *Staphylococcus aureus*: máximo 100 UFC/g
- ❖ Clostrídios sulfito-redutores: máximo 10 UFC/g
- ❖ *Salmonella*: Neg/25g
- ❖ Bolores e leveduras: máximo 200 UFC/g

Para controlar estes limites, a empresa tem um plano de análises microbiológicas mensal, feito por um laboratório externo, a um produto de cada linha de produção de produtos em pó e a um produto da família dos produtos líquidos.

A ENF tem, também, planos de análises microbiológicas à água e às superfícies.

Toda e qualquer matéria-prima que seja comprada e consumida na produção tem de ser acompanhada, à chegada, com os respectivos certificados de análise microbiológica, e, caso estejam fora dos limites desejados, será devolvida de imediato ao fornecedor.

Sendo que a empresa se rege por estes limites, serão estes que irão servir como base para a comparação com os resultados que se irão obter através das ferramentas de Microbiologia Preditiva. No entanto, as ferramentas serão utilizadas apenas para prever o crescimento dos microrganismos patogénicos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*.

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva, pode crescer a temperaturas entre 7°C e 48°C, com um pH óptimo entre 6 e 7, com valores mínimos de actividade de água na ordem dos 0,83, em ambiente aeróbio, e 0,90, em ambiente anaeróbio, e que se apresenta sob forma esférica (cocos), agrupando-se em pequenas cadeias lineares ou em pequenos grupos como que "cachos".

Este microrganismo produz uma enterotoxina, infecciosa para os Humanos. Os sintomas provocados por uma contaminação com esta toxina são, normalmente rápidos e agudos, dependendo da sensibilidade e da saúde de cada indivíduo, e da quantidade ingerida, tanto de alimento como de toxina. Os sintomas mais comuns são náuseas, vômitos, dores abdominais e enfraquecimento, podendo não serem todos activos em cada indivíduo. Em casos mais severos, podem haver outros sintomas como dores de cabeça, câibras e alterações na pressão sanguínea e pulsação. A recuperação do paciente ocorre, normalmente, em dois dias, podendo ser mais prolongada em casos mais graves. A dose infecciosa para esta toxina é inferior a uma micrograma, sendo este valor atingido quando a população de *S. aureus*, num alimento, é superior a 10^6 UFC/gr. A morte derivada desta infecção é muito rara, embora existam relatos de algumas mortes em idosos, crianças e pessoas muito debilitadas.

Este microrganismo encontra-se com frequência em carnes e produtos derivados, aves e ovos, leite e produtos derivados, bem como em produtos de pastelaria, incluindo bolos com creme ou tartes. Os produtos alimentares que sofram muito manuseamento na sua produção e que estejam expostos a temperaturas ligeiramente elevadas são frequentemente relacionados com a intoxicação por *S. aureus*.

As espécies de *Staphylococcus* encontram-se no ar, poeiras, esgotos, água, leite, alimentos ou equipamentos da indústria alimentar, superfícies, no ser humano e nos animais. Está presente nos canais nasais, garganta e nos cabelos e pele de mais de 50% dos indivíduos saudáveis, sendo que esta incidência é maior em pessoas que têm contacto habitual com ambientes hospitalares.

Relativamente a infecções alimentares, estas são normalmente causadas pelo manuseamento por parte dos trabalhadores, no entanto, a contaminação também pode advir dos equipamentos e das superfícies que entram em contacto com os alimentos. Os alimentos onde se observa um maior número de casos de contaminação por *S. aureus* resultam de armazenamentos incorrectos, que deveriam encontrar-se acima de 60°C ou abaixo de 7,2°C.

A *Salmonella* é uma bactéria Gram negativa, cresce a temperaturas entre 7°C e 47°C, a valores de pH entre 4 e 9,5, com valor mínimo de actividade da água de 0,96, tem forma bacilar, sem cápsula, maioritariamente móveis e não origina esporos. Existe uma grande ocorrência deste microrganismo em animais, especialmente em aves e suínos. As doenças relacionadas com *Salmonella* são comumente denominadas por salmoneloses, sendo a febre tifóide a mais aguda, causada pela infecção por *S. typhi*. Existem outras espécies do género que produzem sintomas semelhantes. Estes podem ser náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreias, dores de cabeça e febres, aparecendo os primeiros entre 6 a 48 horas após ingestão e sendo a dose infecciosa na ordem das 10 UFC/gr para *S. typhi*, sendo necessária uma dose superior para o caso de outras espécies de

Salmonella. Relativamente à duração, os sintomas mais agudos podem durar um a dois dias, ou mais, dependendo da saúde do hospedeiro, da dose ingerida e das características da estirpe. A causa da doença origina-se no epitélio do intestino delgado, quando o microrganismo o atravessa, proveniente do lúmen do intestino.

A *Salmonella* encontra-se em alimentos como carnes, aves, ovos, leite e derivados, peixe, marisco, produtos de pastelaria e, relativo ao tema da dissertação, em bolos e sobremesas com creme. Algumas espécies deste género foram já isoladas a partir do exterior de ovos. Este microrganismos está, também, presente na água, nos solos, insectos, fezes de animais, superfícies de cozinhas e industriais.

Todos os grupos etários estão sujeitos a uma contaminação por *Salmonella*, no entanto, os sintomas são mais severos em idosos, crianças e adoentados. Pacientes com SIDA têm frequentes salmoneloses, cerca de vinte vezes mais do que o resto da população, e podem sofrer de episódios recorrentes.

Existem mortes associadas a este microrganismo, sendo *S. typhi* e *S. paratyphi* (originam febre tifóide nos humanos) os que apresentam maiores taxas, cerca de 10% de mortes, em contraste com a média inferior a 1% para a maioria das salmolenoses.

A espécie *E. coli* faz parte da flora intestinal dos humanos e de outros primatas, são Gram negativas, anaeróbias facultativas, não produzem esporos, são maioritariamente móveis e têm forma bacilar. Podem crescer a temperaturas entre 7°C e 46°C, com uma actividade de água mínima de 0,95 e em valores de pH de 4,4 a 10. Uma parte das estirpes deste microrganismo têm capacidade de causar gastroenterite, e outras doenças, no ser humano. Estas são conhecidas como *E. coli* enterovirulentas e estão divididas em quatro classes: Enteroinvasiva, Enterotoxigénica, Enteropatogénica e Enterohemorrágica.

Relativamente à Enteroinvasiva, não são conhecidos os alimentos que podem albergar esta estirpe, e que possa causar disenteria, no entanto, alguns estudos recentes têm vindo a relacionar com carne para hambúrguer e leite não pasteurizado. Após a ingestão do alimento contaminado, o microrganismo invade as células epiteliais do intestino, dando origem a uma forma de disenteria, doença caracterizada pelo aparecimento de sangue e muco nas fezes dos hospedeiros, dores abdominais, diarreia, vômito, febre e arrepios. A dose infecciosa é cerca de, apenas, 10 UFC e, os primeiros sintomas, podem surgir entre 12 a 72 horas após ingestão do alimento contaminado. Não existe um grupo de risco específico para contaminação, pois qualquer indivíduo está sujeito a contrair esta doença.

A classe Enterotoxigénica da *E. coli* é maioritariamente relacionada com episódios de diarreias em crianças de países menos desenvolvidos e em turistas que viajam até esses países. A doença causada por esta estirpe é a gastroenterite, que apresenta sintomas frequentes de diarreias aquosas, dores abdominais, febre ligeira, náuseas e mau estar. Estes microrganismos colonizam o intestino delgado e produzem toxinas que induzem a secreção de fluidos. A dose infecciosa é relativamente elevada sendo necessários entre 10^7 a 10^9 UFC/gr para causar doença, no entanto, em crianças esta pode ser mais diminuta.

Esta classe não é considerada uma doença alimentar no seu todo, em países que tenham boas práticas e protocolos de higiene. A contaminação alimentar pode ocorrer através de águas contaminadas com águas residuais, sendo estes microrganismos frequentemente isolados de lacticínios, como queijos frescos ou requeijão.

A *E. coli* Enteropatogénica está normalmente associada a diarreias infantis, caracterizadas por serem diarreias aquosas ou com sangue. A dose infecciosa é acima de 10^6 UFC/gr, no caso de adultos, e presumivelmente muito baixa em crianças. Esta classe está associada a alimentos como carne de vaca e galinha, embora qualquer alimento exposto a possível contaminação fecal pode originar doença. Diarreias prolongadas em crianças podem levar a desidratação e morte, sendo que, em países de terceiro mundo, a taxa de mortalidade anda à volta dos 50%.

Da classe Enterohemorrágica, a estirpe que causa mais preocupação em termos de saúde pública é a *E. coli* O157:H7. Esta é uma estirpe rara que produz grandes quantidades de toxinas que causam danos severos no intestino do hospedeiro. A doença aguda causada por esta estirpe é denominada de colite hemorrágica. Esta é caracterizada por dores abdominais severas e diarreias, inicialmente aquosas e que se vão tornando cada vez mais sanguíneas. Podem ocorrer, ainda, vómitos ocasionais e a doença dura, em média, oito dias. A dose infecciosa pode ser menos de 10 UFC e esta estirpe tem capacidade de passar de pessoa a pessoa, que habitem em ambientes com crianças e bebés. A doença pode levar a perda total de funções dos rins e pode ter uma taxa de mortalidade de 50%, em idosos.

Os alimentos relacionados com esta estirpe são carne de vaca mal cozinhada, sumos de fruta não pasteurizados, salames curados, alface, leite e queijos. Toda a população está sujeita a contrair doença provocada por esta estirpe, no entanto, são as faixas etárias correspondentes às crianças e aos idosos que apresentam, com maior frequências, os sintomas mais graves.

3.4 Prazos de validade

Como qualquer empresa dentro da indústria alimentar, a determinação de prazos de validade é algo que não pode ser levado de ânimo leve, pois o impacto nos consumidores finais é bastante grande e falhas na segurança e na qualidade dos produtos não devem ocorrer, e a ENF não é excepção.

Para tal, a empresa tem definidas instruções de processo que definem os testes de validade que têm de ser feitos aos produtos, especialmente aquando do seu desenvolvimento, denominados de "Testes de *shelf-life*".

O objectivo dessas instruções passa por estabelecer sistemas de avaliação de conformidade para as validades que se atribuem aos produtos fabricados, recorrendo a procedimentos que reflectam as condições reais de armazenamento e manipulação que os produtos sofrem no seu tempo de vida. São essencialmente indicados para novos desenvolvimentos e que, em função de características definidas pelo I&D, se considerem diferentes de produtos que já se fabricam. No entanto, os testes também podem ser utilizados para produtos que já existam em produção.

O procedimento destes testes inicia-se com a **recolha de amostras**. Estas devem ser colocadas na embalagem original ou numa embalagem de características idênticas. Devem ser armazenadas quatro amostras a temperatura ambiente e três amostras a 38°C.

A **duração** do armazenamento deve ser, para o caso das amostras a temperatura ambiente, a totalidade da validade, mais 1/3 da mesma. No caso das amostras armazenadas a 38°C, o armazenamento deve corresponder a 1/3 da validade do produto.

Os **testes** devem ser feitos com uma periodicidade definida. No caso das amostras armazenadas a temperatura ambiente, estas devem ser testadas a cada 1/3 da validade real do produto. Para as amostras armazenadas a 38°C, os testes devem ser feitos a cada 1/3 do tempo de armazenamento, que é 1/3 da validade do produto. Para ambos os casos, os testes terminam quando termina o período de armazenamento ou caso se verifiquem resultados com desvios significativos, nesta situação deve ser avisado o responsável do I&D e este decidirá os passos seguintes. Caso não tiverem sido detectados desvios, deve ser feito mais um teste passado o equivalente a 1/3 da validade do produto.

Podem ser feitos vários **tipos de testes**, desde testes de temperatura, físico-químicos, microbiológicos, sensoriais e/ou testes de aplicação. A escolha dos testes a realizar cabe ao técnico de I&D, de acordo com os testes que considere necessários efectuar para uma correcta avaliação da validade do produto.

No caso de se recorrerem a testes sensoriais, estes devem ser feitos por um mínimo de cinco provadores. Cada provador realiza duas provas, com três amostras cada, com duas amostras iguais e uma terceira diferente. Nessas provas são testadas as amostras armazenadas à temperatura ambiente *versus* uma referência, e amostras armazenadas a 38°C *versus* uma referência. Nestas, o provador tem de tentar perceber se existe diferença entre as três amostras, e, no tratamento estatístico dos resultados, considera-se aceitável um desvio inferior a 5%. No caso de desvios superiores deve-se sempre contactar o técnico de I&D responsável pelo produto.

Com alguma periodicidade, são testadas amostras fora da validade para **verificar** se os produtos cumprem as especificações após o fim do prazo estipulado. No caso de não cumprimento das especificações, iniciam-se testes para rever a validade atribuída ao produto em questão.

Explicado o processo de determinação de prazos de validade, resta saber a validade que é atribuída pela ENF aos cremes de pasteleiro em estudo. A tabela seguinte mostra a validade, em meses, que foi definida para cada um dos produtos, sendo a última actualização datada de 28/07/2009.

Tabela 3.3 - Validade dos cremes de pasteleiro em estudo.

PRODUTOS	VALIDADE (MESES)
Cremes pasteleiro de elaboração a frio	9
Cremes pasteleiro de elaboração a quente	9
Crema Pasteleiro prontos a usar	8/9
Cremes com pH < 3,5	12/24

Serão estes os prazos de validade que servirão de base de comparação com os resultados que se irão obter através das ferramentas de Microbiologia Preditiva.

O armazenamento de todos os produtos produzidos na empresa ENF é feito à temperatura e humidade ambientes, pois são considerados produtos que não necessitam de cuidados excepcionais. Assim, para as ferramentas de Microbiologia Preditiva, a temperatura a considerar será de 25°C.

Após um conhecimento sobre a Microbiologia Preditiva, uma apresentação das ferramentas que serão utilizadas e uma introdução à empresa e aos produtos, serão demonstrados os resultados obtidos para cada um dos cremes analisados, utilizando as duas ferramentas de Microbiologia Preditiva (*ComBase* e *PMP*).

Capítulo 4 - Resultados

Antes de expor os resultados, vale a pena relembrar os limites microbiológicos definidos pela ENF para os seus produtos:

- ❖ *Escherichia coli*: máximo 10 UFC/g
- ❖ *Staphylococcus aureus*: máximo 100 UFC/g
- ❖ *Salmonella*: Neg/25g

São estes que vão servir de referência para comparar e discutir os resultados obtidos com as ferramentas de Microbiologia Preditiva.

Deve-se também ter em conta os intervalos dos parâmetros microbiológicos (temperatura, pH, salinidade e a_w) destes microrganismos patogénicos, definidos pelas duas ferramentas (tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Intervalos dos parâmetros microbiológicos, de acordo com as duas ferramentas.

	<i>ComBase</i>				<i>Pathogen Modeling Program</i>		
	Temp. (°C)	pH	a_w	NaCl (%)	Temp. (°C)	pH	NaCl (%)
<i>Escherichia coli</i>	10 - 42	4.5 - 7.5	0.961 - 1	0.0 - 6.5	5.0 - 42.0	4.5 - 8.5	0.5 - 5.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.5 - 30	4.4 - 7.1	0.907 - 1	0.0 - 13.5	10.0 - 42.0	4.5 - 9.0	0.5 - 12.5
<i>Salmonella</i>	7 - 40	3.9 - 7.4	0.973 - 1	0.0 - 4.6	10.0 - 45.0	-	-

Como é possível verificar, a ferramenta PMP só considera a temperatura na análise do crescimento de *Salmonella*. Assim, apenas será feita uma análise, uma vez que, para o presente estudo, só será considerada a temperatura ambiente de 25°C. Os resultados da análise de *Salmonella* estão demonstrados na Figura 4.3 (gráfico C) e na Tabela 4.3.

No armazenamento dos cremes em pó (Cremes a Frio e Cremes a Quente) a humidade presente nos mesmos é praticamente nula, atingindo no máximo 10%. Deste modo, o a_w é bastante reduzido, sendo muito inferior aos limites mínimos de cada um dos microrganismos patogénicos, admitidos por ambas as ferramentas. Assim, torna-se impossível determinar o crescimento microbiológico a estas condições, recorrendo à Microbiologia Preditiva (como demonstrado na Figura 4.1).

ComBase Predictor

☒ Growth model
 ☐ Thermal inactivation model
 ☐ Non thermal survival model

Temperature input **Water activity** **Observation duration**

☒ Static ☐ Changing temperature
 ☐ NaCl ☒ Aw
 Time (h) 23.00

add a row

Initial level	Phys.state	T (°C)	pH	Aw	Max.rate (log.conc/h)	Dbl.time (h)
0	[0-1]	25	7	0.10 *		

remove last row

• NaCl(%) or Aw must be within the indicated range

Figura 4.1 - Exemplo de erro devido a valores fora dos limites microbiológicos (*ComBase Predictor*)

Deste modo, tanto para os Cremes a Frio como para os Cremes a Quente (que têm a mesma problemática), os resultados considerados serão demonstrativos do que aconteceria após a preparação dos cremes em si.

Para discutir os resultados que se obterão da análise dos cremes em pó após preparação, ter-se-ão em conta as doses infecciosas, para o Homem, consideradas para cada microrganismo [20, 21]:

- *Staphylococcus aureus*: $> 10^6$ UFC/gr.

- *Salmonella typhi*: > 10 UFC/gr. Outras espécies de *Salmonella spp.*: $10^4 - 10^7$ UFC/gr. Daqui em diante, a designação de *Salmonella* referir-se-á à espécie *Salmonella typhi*.

- *Escherichia coli*: $10^6 - 10^8$ UFC/gr. No entanto, irá ter-se em conta a estirpe O157:H7, que representa, actualmente, uma maior preocupação em termos de patogenicidade, possuindo uma dose infecciosa muito diminuta, de 10 a 100 UFC/gr. O PMP faz a análise de *E. coli* recorrendo aos estudos desta estirpe.

No caso da *Salmonella* e *E. coli* O157:H7, a ferramenta PMP, ao iniciar a análise já acima das doses infecciosas de ambos (inicia em 10^3), não permite visualizar as horas em que se atingirá essas mesmas doses.

Estas doses também irão ser tidas em conta na análise dos Recheios Líquidos. Será ainda feita a comparação com as análises microbiológicas realizadas por um laboratório externo à ENF, para este tipo de cremes.

4.1 Cremes a Frio

➤ 4.1.1 CF1

❖ Características do produto:

Temperatura de armazenamento = 25°C

pH = 7,00

Salinidade (%NaCl) = 0%

○ ComBase Predictor

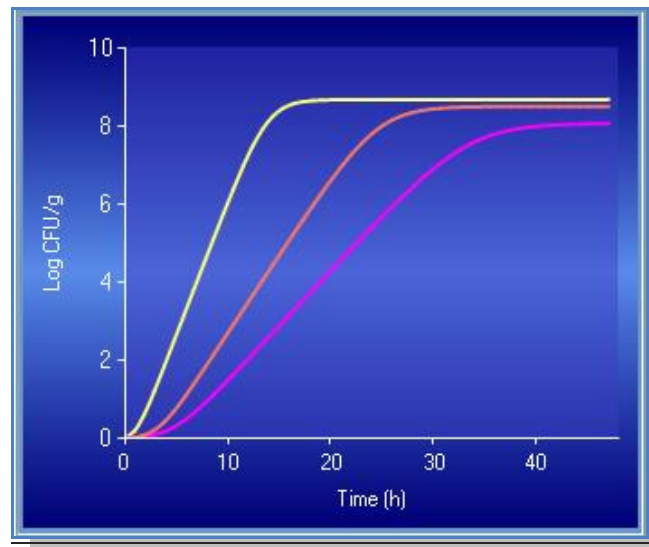


Figura 4.2 - Previsão de crescimento para CF1, em 48 horas (amarelo - *E. coli*; rosa - *S. aureus*; laranja - *Salmonella*).

Tabela 4.2 - Valores da concentração de células viáveis em CF1 (laranja - dose infecciosa para *E. coli* O157:H7 atingida; vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

tempo(h)	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
0.00	0.00	0.00	0.00
0.96	0.20	0.02	0.03
2.88	1.22	0.10	0.22
5.76	3.17	0.46	1.04
10.56	6.40	1.65	2.93
20.16	8.69	4.35	6.67
23.04	8.70	5.15	7.59
26.88	8.70	6.18	8.28
30.72	8.70	7.07	8.48
35.52	8.70	7.78	8.52
40.32	8.70	8.02	8.52
46.08	8.70	8.08	8.52
47.04	8.70	8.08	8.52

○ *Pathogen Modeling Program*

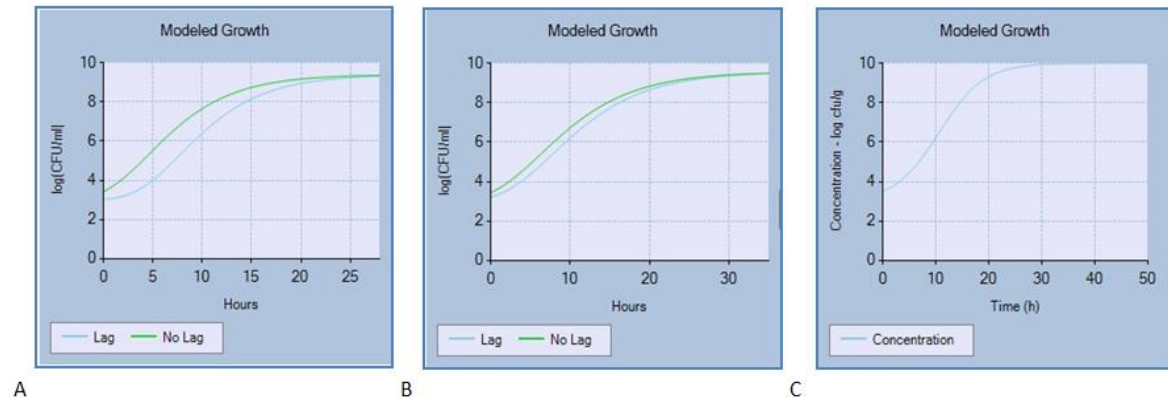


Figura 4.3 - Previsões de crescimento, para CF1 (A - *E. coli*; B - *S. aureus*; C - *Salmonella*).

Tabela 4.3 - Valores de concentração ao longo do tempo em CF1 (vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>Salmonella</i>	
Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)
	Lag	No Lag		Lag	No Lag		
0.00	3.03	3.42	0.00	3.21	3.43	0.0	3.505
1.00	3.08	3.71	1.00	3.35	3.64	1.0	3.629
2.00	3.19	4.09	2.00	3.53	3.90	2.0	3.779
3.00	3.37	4.53	5.00	4.37	4.90	3.0	3.960
4.00	3.65	5.02	8.00	5.46	6.02	4.0	4.175
6.00	4.44	6.02	9.60	6.06	6.59	5.0	4.427
9.20	6.01	7.38	10.00	6.20	6.72	10.0	6.203
15.00	8.15	8.74	15.00	7.73	8.07	20.0	9.311
20.00	8.94	9.16	20.00	8.65	8.83	40.0	9.994
27.60	9.31	9.35	30.00	9.37	9.41	47.0	9.999
28.00	9.31	9.36	35.00	9.48	9.50	50.0	9.999

De acordo com o programa *ComBase*, e recorrendo à tabela 4.2, torna-se possível observar que após 2.88 horas do creme ser preparado, atinge-se o patamar em que, no caso de haver contaminação com *E. coli* O157:H7, esta toma dimensões que correspondem à dose infecciosa para o Homem. Por volta das 5.76 horas, após preparação do creme, é atingida a dose infecciosa de *Salmonella*, caso o creme tenha sido contaminado por este microrganismo. Cerca de cinco horas depois, aproximadamente às 10.56 horas, atinge-se a dose infecciosa de *E. coli*, portanto, antes de passar meio dia, já foram atingidos três doses infecciosas. No caso de *S. aureus*, a dose infecciosa é apenas atingida mais de 1 dia depois, por volta de 26.88 horas, após preparação do creme.

Em termos de crescimento, antes de se concluir um dia, atinge-se a fase estacionária de *E. coli*, o primeiro dos três microrganismos a estabilizar o seu crescimento. Para os restantes microrganismos, a estabilização ocorre no segundo dia, sendo que a *Salmonella* atinge a fase estacionária 35.52 horas após preparação do creme e *S. aureus* alcança esta fase por volta das 46 horas, sendo o último dos microrganismos a estabilizar.

Recorrendo ao PMP e à respectiva tabela 4.3, ao considerar um nível inicial de contaminação de 10^3 , as doses infecciosas de *E. coli* e *S. aureus* são atingidas em menos de 10 horas, tanto para as análises com fase de latência como para as análises sem fase de latência. No caso da *E. coli*, a diferença entre as doses infecciosas atingidas com e sem latência é de cerca de três horas, ou seja, necessita de uma maior adaptação ao meio, quando comparada com *S. aureus*, que tem uma diferença de menos de duas horas.

Em relação ao crescimento, tal como no *ComBase*, a *E. coli* é o primeiro microrganismo a atingir a fase estacionária, por volta das 28 horas. No entanto, de acordo com esta ferramenta, *S. aureus* atinge a fase estacionária por volta das 35 horas, antes da *Salmonella*, que só estagna o seu crescimento por volta das 47 horas, informação contrária àquela que é fornecida pelos dados da ferramenta *ComBase*.

De denotar, também, a diferença dos valores das concentrações a que se atingem as fases estacionárias, em ambas as ferramentas. A primeira fornece-nos valores de estabilização na ordem dos 10^8 , enquanto que o PMP mostra resultados na ordem dos 10^9 . Facto que se mostrou idêntico para todos os cremes analisados.

➤ 4.1.2 CF2

❖ Características do produto:

Temperatura de armazenamento = 25°C

pH = 6,40

Salinidade (%NaCl) = 0,288%

○ ComBase Predictor

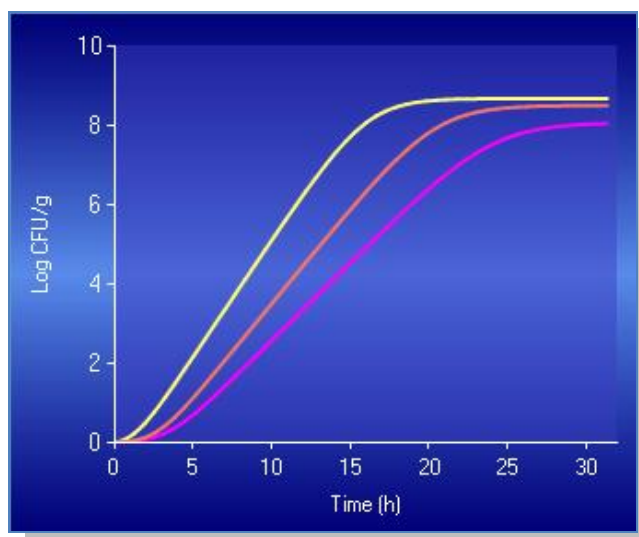


Figura 4.43 - Previsão de crescimento para CF2, em 32 horas (amarelo - *E. coli*; rosa - *S. aureus*; laranja - *Salmonella*).

Tabela 4.4 - Valores da concentração de células viáveis em CF2 (laranja - dose infecciosa para *E. coli* O157:H7 atingida; vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

tempo(h)	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
0.00	0.00	0.00	0.00
0.64	0.09	0.02	0.02
3.20	1.14	0.25	0.43
5.12	2.25	0.75	1.19
10.24	5.25	2.68	3.63
10.88	5.62	2.93	3.94
11.52	5.99	3.19	4.25
15.36	7.87	4.69	6.05
19.20	8.60	6.13	7.60
25.60	8.69	7.79	8.48
26.88	8.70	7.91	8.50
29.44	8.70	8.03	8.52
31.36	8.70	8.07	8.52

○ *Pathogen Modeling Program*

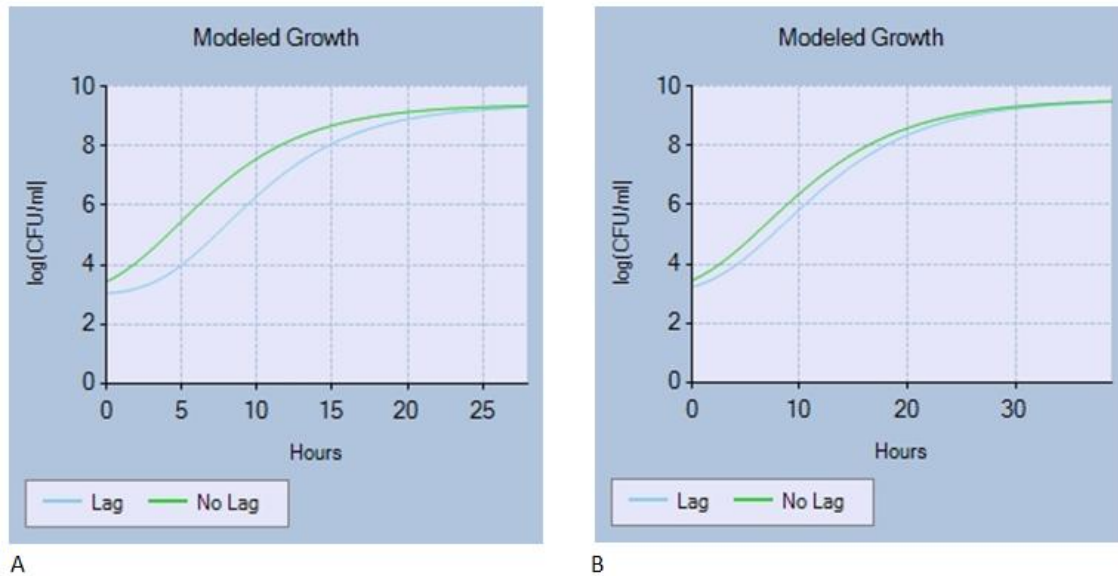


Figura 4.5 - Previsões de crescimento, para CF2 (A - *E. coli*; B - *S. aureus*).

Tabela 4.5 - Valores de concentração ao longo do tempo em CF2 (vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)	
	Lag	No Lag		Lag	No Lag
0.00	3.03	3.42	0.00	3.21	3.43
5.00	3.98	5.46	5.00	4.21	4.71
6.20	4.49	6.04	9.00	5.50	6.06
9.40	6.03	7.37	10.00	5.84	6.38
10.00	6.31	7.57	10.60	6.04	6.57
20.00	8.90	9.14	20.00	8.35	8.58
27.60	9.29	9.35	38.60	9.47	9.49
27.80	9.30	9.35	38.80	9.48	9.49
28.00	9.30	9.35	39.00	9.48	9.50

De acordo com o programa *ComBase*, e observando a tabela 4.4, verifica-se que após 3.20 horas da preparação do creme atinge-se a dose infecciosa de *E. coli* O157:H7. As doses infecciosas de *Salmonella* e *E. coli* são atingidas antes de passar meio dia, aproximadamente 5 horas para a primeira e cerca de 11.52 horas para a *E. coli*. Por sua vez, a dose infecciosa de *S. aureus* é atingida por volta de 19h12min, após preparação do creme.

Relativamente ao crescimento, o de *E. coli*, sendo o mais rápido, é o primeiro a atingir a fase estacionária, estagnando por volta das 27 horas. Pouco mais de duas horas depois, atinge-se o patamar estacionário da *Salmonella*, e, por fim, após 31.36 horas da preparação de CF2, *S. aureus* chega à sua fase estacionária.

Recorrendo ao PMP e à tabela 4.5, as doses infecciosas de *E. coli* são atingidas em cerca de 6 horas, sem fase de latência, e perto de 10 horas, com fase de latência. No caso de *S. aureus*, as respectivas doses infecciosas são atingidas por volta de 9 horas, sem fase de latência, e cerca de 10.60 horas, com fase de latência, após preparação. Este último apresenta um intervalo menor entre Lag/No Lag, comparativamente à *E. coli*, denotando uma menor necessidade de adaptação ao meio.

Em termos de estabilização de curva, a *E. coli* atinge a fase estacionária por volta de 27 a 28 horas, tanto para a previsão com fase de latência como para a previsão sem fase de latência, sendo a segunda a primeira a ser atingida. Pelo contrário, no caso de *S. aureus*, a previsão com fase de latência é a primeira a atingir o patamar estacionário, mas apenas com uma pequena diferença, relativamente à previsão sem fase de latência.

➤ 4.1.4 CF3

❖ Características do produto:

Temperatura de armazenamento = 25°C

pH = 6,50

Salinidade (%NaCl) = 0,151%

○ ComBase Predictor

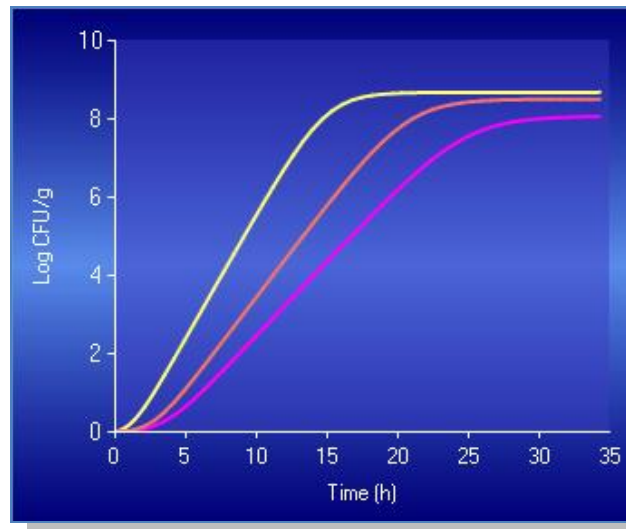


Figura 4.6 - Previsão de crescimento para CF3, em 35 horas (amarelo - *E. coli*; rosa - *S. aureus*; laranja - *Salmonella*).

Tabela 4.6 - Valores da concentração de células viáveis em CF3 (laranja - dose infecciosa para *E. coli* O157:H7 atingida; vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

tempo(h)	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
0.00	0.00	0.00	0.00
0.70	0.11	0.02	0.02
2.80	1.03	0.17	0.31
4.90	2.33	0.63	1.07
10.50	5.86	2.66	3.69
11.20	6.28	2.93	4.02
15.40	8.23	4.52	5.98
19.60	8.67	6.06	7.65
24.50	8.69	7.48	8.43
25.20	8.70	7.61	8.46
25.90	8.70	7.72	8.48
29.40	8.70	8.00	8.52
34.30	8.70	8.08	8.52

○ *Pathogen Modeling Program*

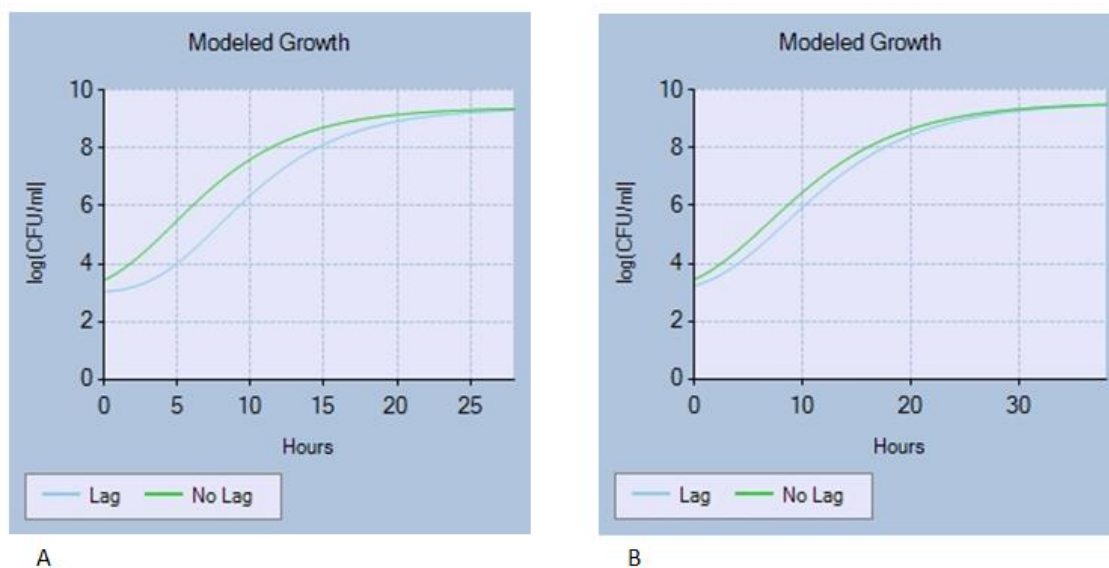


Figura 4.7 - Previsões de crescimento, para CF3 (A - *E. coli*; B - *S. aureus*).

Tabela 4.7 - Valores de concentração ao longo do tempo em CF3 (vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)	
	Lag	No Lag		Lag	No Lag
0.00	3.03	3.42	0.00	3.22	3.43
1.00	3.09	3.71	1.00	3.34	3.62
4.00	3.65	4.99	2.00	3.51	3.86
5.00	4.00	5.49	5.00	4.25	4.75
6.20	4.52	6.08	8.60	5.45	6.00
9.40	6.08	7.41	10.00	5.94	6.46
10.00	6.36	7.61	10.20	6.01	6.52
20.00	8.92	9.15	20.00	8.43	8.65
25.00	9.23	9.31	25.00	8.99	9.10
27.20	9.29	9.34	30.00	9.28	9.34
27.40	9.30	9.35	35.00	9.43	9.46
27.60	9.30	9.35	37.60	9.47	9.49
27.80	9.31	9.35	37.80	9.48	9.49
28.00	9.31	9.35	38.00	9.48	9.50

De acordo com o programa *ComBase*, e recorrendo à tabela 4.6, a dose infecciosa de *E. coli* O157:H7 é atingida 2.80 horas após a preparação do creme. No caso da *Salmonella*, esta dose é atingida em pouco menos de 5 horas. A dose de *E. coli* atinge-se 11.20 horas após a elaboração do creme. Relativamente à dose infecciosa de *S. aureus*, esta é atingida após 19.60 horas.

Em termos de fases estacionárias, em todos os casos são atingidas um dia após a preparação de CF3. O microrganismo que pára o seu crescimento mais cedo é a *E. coli*, por volta das 25 horas, seguindo-se a *Salmonella*, cujo crescimento estagna após 29.40 horas. Por fim, o crescimento de *S. aureus* atinge a fase estacionária por volta de 34 horas após elaboração do creme.

Recorrendo ao PMP e à respectiva tabela 4.7, as doses infecciosas de *E. coli* são atingidas em cerca de 6 horas (sem fase de latência) e perto das 10 horas (com fase de latência). As doses de *S. aureus* são atingidas com um intervalo menor entre Lag/No Lag, comparativamente à *E. coli* (entre 8 e 11 horas), levando a concluir que não necessitou de tanto tempo para se adaptar às novas condições a que foi exposto.

Quanto à estabilização da curva, esta ocorre após 27 horas, no caso de *E. coli*, para ambas as previsões. No que respeita a *S. aureus*, atinge-se a fase estacionária por volta de 38 horas de exposição do creme, tanto para a previsão com fase de latência como para a previsão sem fase de latência.

4.2 Cremes a Quente

➤ 4.2.1 CQ1

❖ Características do produto:

Temperatura de armazenamento = 25°C

pH = 4,20

Salinidade (%NaCl) = 1,860%

○ ComBase Predictor

A este valor de pH, apenas se torna possível determinar o crescimento para *Salmonella*, pois é um valor abaixo dos limites microbiológicos determinados, pelo programa, para os outros dois microrganismos.

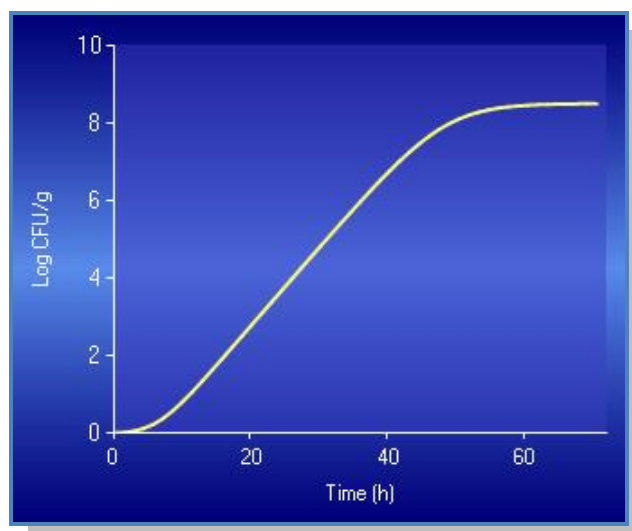


Figura 4.8 - Previsão de crescimento para CQ1, em 72 horas (*Salmonella*).

Tabela 4.8 - Valores da concentração de células viáveis em CQ1 (vermelho - Dose infecciosa atingida; verde - estabilização da curva).

	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)
tempo(h)	<i>Salmonella</i>
0.00	0.00
1.44	0.02
5.76	0.23
10.08	0.82
11.52	1.08
20.16	2.80
40.32	6.79
60.48	8.48
69.12	8.52
70.56	8.52

- *Pathogen Modeling Program*

Não se tornou possível determinar o crescimento dos microrganismos.

De acordo com o programa *ComBase*, e recorrendo à tabela 4.8, o baixo pH leva a que seja atingida a dose infecciosa de *Salmonella* mais tardiamente do que na maioria dos outros cremes, por volta das 11/12 horas.

Este microrganismo continua em crescimento exponencial durante dias, até que 69 horas após preparação do creme atinge a sua fase estacionária.

Tal como no *ComBase*, a ferramenta PMP não permitiu obter resultados para o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, devido ao pH deste creme se encontrar abaixo dos limites microbiológicos considerados pelo programa, como verificado na tabela 4.1.

➤ 4.2.2 CQ2

❖ Características do produto:

Temperatura de armazenamento = 25°C

pH = 4,95

Salinidade (%NaCl) = 0,522%

○ ComBase Predictor

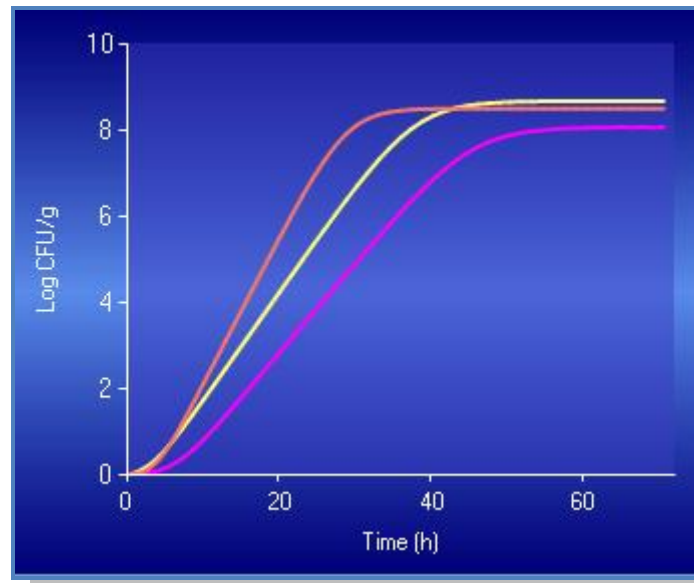


Figura 4.9 - Previsão de crescimento para CQ2, em 72 horas (amarelo - *E. coli*; rosa - *S. aureus*; laranja - *Salmonella*).

Tabela 4.9 - Valores da concentração de células viáveis em CQ2 (laranja - dose infecciosa para *E. coli* O157:H7 atingida; vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

tempo(h)	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
0.00	0.00	0.00	0.00
1.44	0.08	0.02	0.04
7.20	1.06	0.38	1.18
15.84	3.20	1.97	4.09
20.16	4.28	2.87	5.55
27.36	6.05	4.37	7.65
30.24	6.72	4.97	8.14
36.00	7.85	6.12	8.48
41.76	8.46	7.11	8.52
60.48	8.69	8.07	8.52
63.36	8.70	8.08	8.52
69.12	8.70	8.09	8.52
70.56	8.70	8.09	8.52

○ *Pathogen Modeling Program*

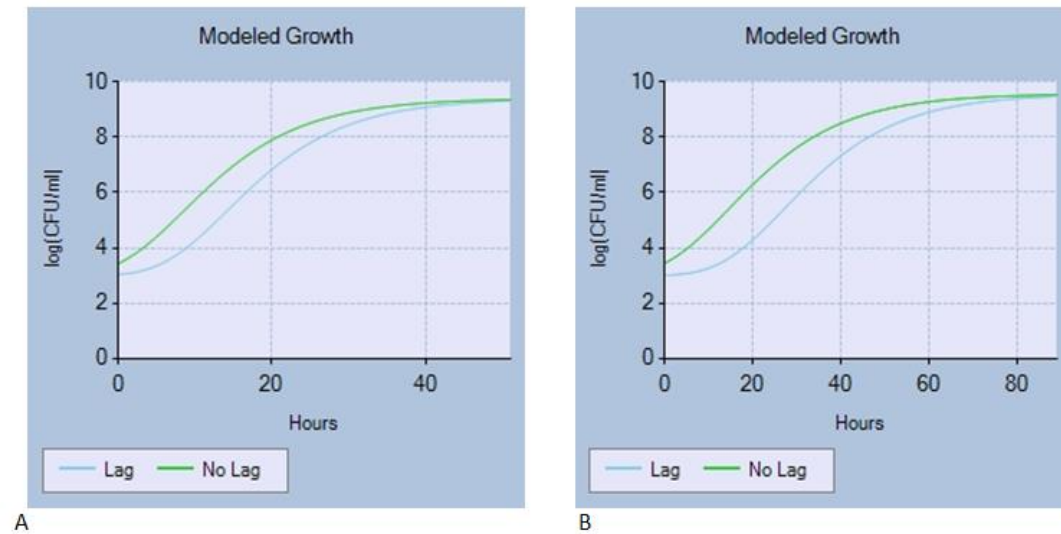


Figura 4.10 - Previsões de crescimento, para CQ2 (A - *E. coli*; B - *S. aureus*).

Tabela 4.10 - Valores de concentração ao longo do tempo em CQ2 (vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)	
	Lag	No Lag		Lag	No Lag
0.00	3.03	3.42	0.00	3.01	3.43
1.00	3.06	3.57	1.00	3.02	3.52
2.00	3.10	3.74	2.00	3.03	3.61
5.00	3.35	4.40	5.00	3.07	3.95
10.00	4.25	5.73	10.00	3.26	4.66
11.20	4.54	6.05	18.40	4.06	6.02
16.80	6.04	7.34	20.00	4.28	6.27
20.00	6.83	7.90	30.00	5.87	7.62
30.00	8.45	8.88	30.80	6.00	7.70
40.00	9.08	9.23	60.00	8.90	9.28
49.60	9.29	9.34	80.00	9.39	9.49
49.80	9.30	9.35	87.80	9.46	9.52
50.60	9.31	9.35	88.00	9.47	9.53
51.00	9.31	9.35	89.00	9.47	9.53

De acordo com o programa *ComBase*, e visualizando a figura 4.9, torna-se possível verificar que, nestas condições, a *Salmonella* apresenta o crescimento mais rápido dos microrganismos em estudo, chegando mesmo a atingir a sua dose infecciosa ao mesmo tempo que *E. coli* O157:H7, por volta de sete horas após preparação do creme. Possivelmente, o baixo pH poderá ser a razão para que as doses infecciosas de *E. coli* e *S. aureus* apenas sejam atingidas após um dia, 27 e 36 horas, respectivamente.

Relativamente ao crescimento, este estabiliza a aproximadamente 42 horas após preparação do creme, no caso da *Salmonella*, que teve o crescimento mais acentuado. A curva de *E. coli* estabiliza passado 63.36 horas. Por último, podemos verificar que, após cerca de 69 horas, o crescimento de *S. aureus* atinge a fase estacionária.

Recorrendo à ferramenta PMP, e à tabela 4.10, é possível verificar que as doses infecciosas de *E. coli* são atingidas por volta de 11 horas, para a previsão sem fase de latência, e cerca de 17 horas, para o caso da previsão com fase de latência. No caso de *S. aureus*, existe uma maior diferença entre as duas previsões, cerca de 19 horas para previsão sem fase de latência e cerca de 31 horas para a previsão com fase de latência, denotando uma maior dificuldade deste microrganismo em adaptar-se às condições do meio onde se encontra.

Em termos de fases estacionárias, tanto em *E. coli* como em *S. aureus*, as previsões com e sem fase de latência atingem esta fase aproximadamente ao mesmo tempo. No caso de *E. coli*, as suas curvas estabilizam por volta das 50 horas. Para *S. aureus*, a estabilização das suas curvas dá-se por volta de 88 horas após preparação do creme.

4.3 Recheios Líquidos

➤ 4.3.1 RL1

❖ Características do produto:

Temp. de arm. = 25°C

pH = 4,65

Sal. (%NaCl) = 0,164%

➤ 4.3.2 RL2

❖ Características do produto:

Temp. de arm. = 25°C

pH = 4,65

Sal. (%NaCl) = 0,164%

As características destes dois cremes são, curiosamente, iguais. Assim sendo, irão ser analisados conjuntamente.

○ ComBase Predictor

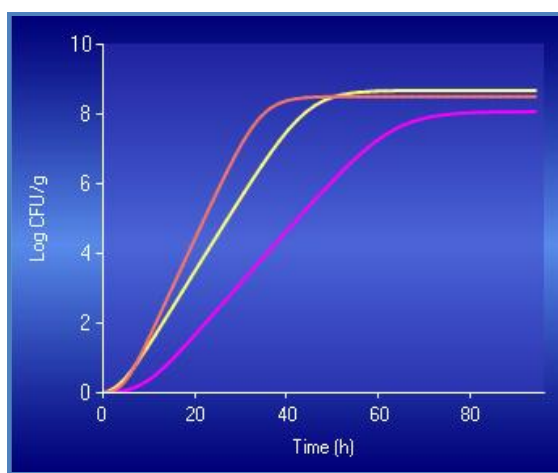


Figura 4.11 - Previsão de crescimento para RL1 e RL2, em 96 horas (amarelo - *E. coli*; rosa - *S. aureus*; laranja - *Salmonella*).

Tabela 4.11 - Valores da concentração de células viáveis em RL1 e RL2 (laranja - dose infecciosa para *E. coli* O157:H7 atingida; vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		
tempo(h)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
0.00	0.00	0.00	0.00
1.92	0.10	0.02	0.05
9.60	1.29	0.34	1.46
21.12	3.73	1.83	4.73
32.64	6.15	3.56	7.66
40.32	7.56	4.70	8.42
49.92	8.50	6.09	8.52
61.44	8.68	7.42	8.52
74.88	8.70	8.01	8.52
84.48	8.70	8.07	8.52
86.40	8.70	8.08	8.52
94.08	8.70	8.08	8.52

○ *Pathogen Modeling Program*

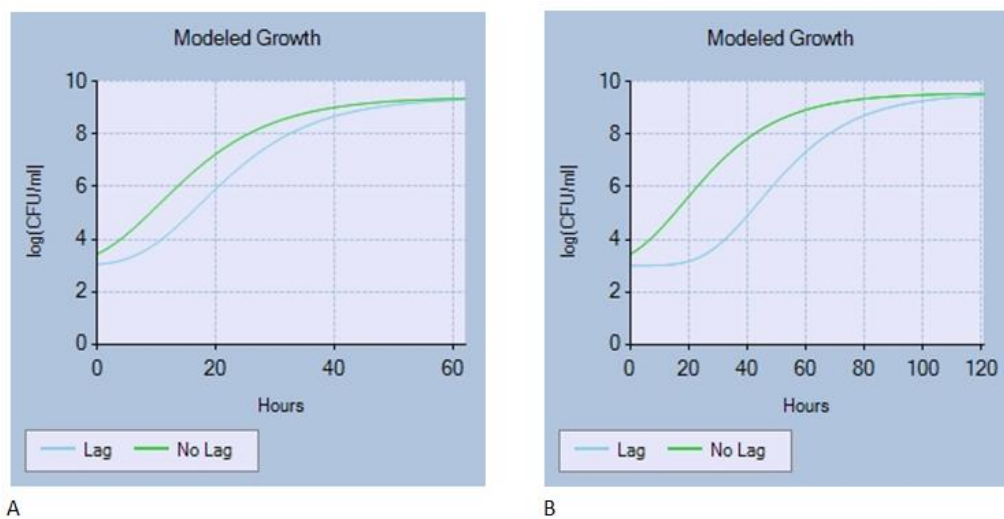


Figura 4.12 - Previsões de crescimento, para RL1 e RL2 (A - *E. coli*; B - *S. aureus*).

Tabela 4.12 - Valores de concentração ao longo do tempo em RL1 e RL2 (vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)	
	Lag	No Lag		Lag	No Lag
0.00	3.04	3.42	0.00	3.00	3.43
1.00	3.06	3.54	1.00	3.00	3.50
5.00	3.25	4.17	5.00	3.00	3.83
10.00	3.84	5.22	10.00	3.01	4.36
13.60	4.51	6.00	20.00	3.16	5.63
20.00	5.90	7.23	23.00	3.29	6.02
20.60	6.03	7.33	30.00	3.77	6.86
30.00	7.70	8.45	40.00	4.89	7.83
40.00	8.67	9.01	48.60	6.01	8.42
50.00	9.11	9.24	50.00	6.19	8.49
61.20	9.30	9.35	90.00	9.05	9.44
61.40	9.30	9.35	119.80	9.46	9.54
61.60	9.30	9.35	120.00	9.47	9.54
61.80	9.30	9.35	120.80	9.47	9.55
62.00	9.30	9.35	121.00	9.47	9.55

As características destes cremes permitiram uma análise conjunta das suas previsões de crescimento microbiano. Apesar de diferentes, o pH e a salinidade destes cremes permitiram considera-los como um só.

Recorrendo à ferramenta *ComBase*, e observando os resultados expressos na tabela 4.11, torna-se possível verificar que a dose infecciosa de *Salmonella* é atingida em menos de 10 horas, ao mesmo tempo que se atinge, também, a dose infecciosa de *E. coli* O157:H7, após 9.60 horas. No caso de *E. coli*, esta dose é atingida passado mais de 1 dia, a 32.64 horas da elaboração dos cremes. Para *S. aureus*, a dose infecciosa atinge-se após mais de 2 dias (49.92 horas).

Quando se atinge a dose infecciosa de *S. aureus*, atinge-se, também, a fase estacionária para a curva de crescimento da *Salmonella*. Relativamente à *E. coli*, a estabilização da curva é atingida por volta de 75 horas, ao passo que, para *S. aureus*, esta fase atinge-se após pouco mais de 86 horas.

A ferramenta PMP, com resultados expressos na tabela 4.12, permite prever uma dose infecciosa de *E. coli* após 13.60 horas da preparação dos cremes, sem ter necessitado de fase de latência, e após 20.60 horas, caso apresente uma fase de latência. Para *S. aureus*, o período de latência foi maior, sendo que a previsão para alcançar a dose infecciosa é de 23 horas, caso não haja fase de latência, e de 48.60 horas, caso haja fase de latência.

Relativamente às estabilizações das curvas de crescimento, em *E. coli* esta estabilização dá-se após 61 horas, tanto para a previsão com latência como para a previsão sem fase de latência. No caso de *S. aureus*, a estabilização das suas curvas ocorre cerca de 120 horas após elaboração do creme.

➤ 4.3.3 RL3

❖ Características do produto:

Temperatura de armazenamento = 25°C

pH = 4,70

Salinidade (%NaCl) = 0,150%

○ ComBase Predictor

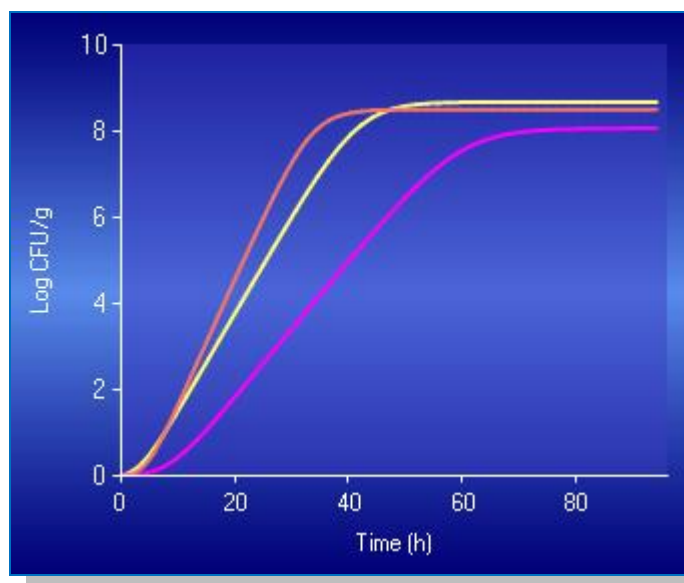


Figura 4.13 - Previsão de crescimento para RL3, em 96 horas (amarelo - *E. coli*; rosa - *S. aureus*; laranja - *Salmonella*).

Tabela 4.13 - Valores da concentração de células viáveis em RL3 (laranja - dose infecciosa para *E. coli* O157:H7 atingida; vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		
tempo(h)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
0.00	0.00	0.00	0.00
1.92	0.11	0.02	0.05
7.68	1.01	0.23	1.00
21.12	4.03	2.02	4.89
30.72	6.17	3.54	7.44
40.32	7.94	5.05	8.45
48.00	8.55	6.21	8.52
61.44	8.69	7.68	8.52
69.12	8.70	7.98	8.52
80.64	8.70	8.07	8.52
90.24	8.70	8.09	8.52
94.08	8.70	8.09	8.52

○ *Pathogen Modeling Program*

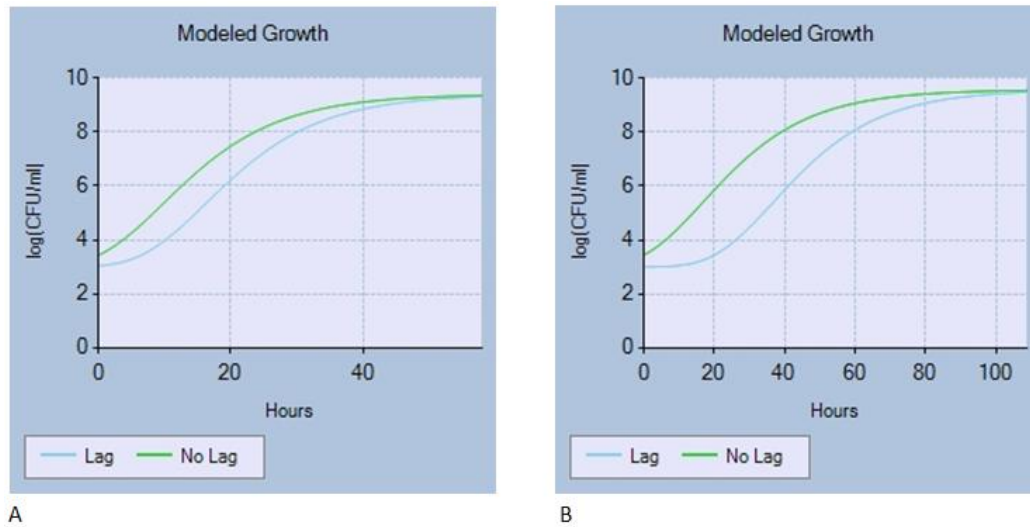


Figura 4.14 - Previsões de crescimento, para RL3 (A - *E. coli*; B - *S. aureus*).

Tabela 4.14 - Valores de concentração ao longo do tempo em RL3 (vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		Horas	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)	
	Lag	No Lag		Lag	No Lag
0.00	3.04	3.42	0.00	3.00	3.43
1.00	3.06	3.55	1.00	3.00	3.51
2.00	3.09	3.69	2.00	3.00	3.59
5.00	3.28	4.24	5.00	3.01	3.87
10.00	3.97	5.38	10.00	3.05	4.45
12.80	4.54	6.04	20.00	3.44	5.84
19.20	6.04	7.34	21.20	3.52	6.01
20.00	6.22	7.47	30.00	4.46	7.12
30.00	7.98	8.62	40.00	5.84	8.07
40.00	8.84	9.10	41.20	6.01	8.16
50.00	9.19	9.29	50.00	7.13	8.69
56.80	9.29	9.34	100.00	9.41	9.52
57.00	9.30	9.35	106.20	9.46	9.54
57.80	9.30	9.35	108.00	9.47	9.54
58.00	9.31	9.35	109.00	9.48	9.54

De acordo com o programa *ComBase*, e com os resultados expressos na tabela 4.13, a dose infecciosa de *Salmonella* é atingida em menos de 8 horas. No mesmo período, atinge-se, também, a dose infecciosa de *E. coli* O157:H7. Para *E. coli*, o valor da dose infecciosa é atingida após mais de 1 dia da fabricação do creme (30.72 horas). No caso de *S. aureus*, esse valor é alcançado após 2 dias, cerca de 48 horas.

A estabilização do crescimento de *Salmonella* ocorre cerca de 48 horas depois da elaboração do creme. No caso de *E. coli*, a fase estacionária dá-se após pouco mais de 69 horas, enquanto *S. aureus* estagna o seu crescimento a partir das 90.24 horas.

Recorrendo ao PMP, e à tabela 4.14, torna-se possível prever uma dose infecciosa de *E. coli* após 12.80 horas, caso não apresente fase de latência, e após 19.20 horas, se tiver fase de latência. Esta fase de latência de cerca de sete horas é bastante reduzida, quando comparada com as vinte horas de latência que *S. aureus* apresenta. Este microrganismo atinge a sua dose infecciosa cerca de 21 horas, caso não apresente fase de latência, e de 41 horas, aproximadamente, com fase de latência. Nestas condições, *S. aureus* necessita de um grande período para se adaptar às condições adversas, comparando com *E. coli*.

Relativamente à fase estacionária do crescimento destes microrganismos, esta é atingida após 57 horas, sem latência, e 58 horas, com latência, para o caso de *E. coli*. Observando os dados para *S. aureus*, a fase estacionária é atingida após 106 horas, sem fase de latência, e após 109 horas, caso necessite de adaptação ao meio.

➤ 4.3.4 RL4

❖ Características do produto:

Temperatura de armazenamento = 25°C

pH = 2,85

Salinidade (%NaCl) = 0%

○ *ComBase Predictor*

Não se tornou possível determinar o crescimento dos microrganismos.

○ *Pathogen Modeling Program*

Não se tornou possível determinar o crescimento dos microrganismos.

Deste modo, e face ao valor de pH de 2,85 que se encontra abaixo dos limites microbiológicos determinados pelos programas, não foi possível prever o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* recorrendo quer ao programa *ComBase* quer ao *Pathogen Modeling Program*.

➤ 4.3.5 RL5

❖ Características do produto:

Temperatura de armazenamento = 25°C

pH = 4,95

Salinidade (%NaCl) = 0,100%

○ ComBase Predictor

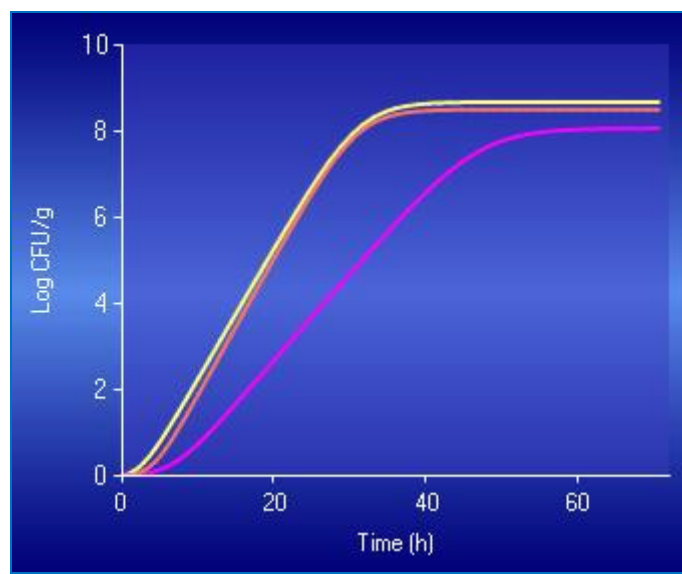


Figura 4.15 - Previsão de crescimento para RL5, em 72 horas (amarelo - *E. coli*; rosa - *S. aureus*; laranja - *Salmonella*).

Tabela 4.15 - Valores da concentração de células viáveis em RL5 (laranja - dose infecciosa para *E. coli* O157:H7 atingida; vermelho - doses infecciosas atingidas; verde - estabilização da curva).

tempo(h)	conc. (Log ₁₀ UFC/gr)		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>
0.00	0.00	0.00	0.00
1.44	0.11	0.02	0.04
5.76	1.01	0.21	0.64
7.20	1.42	0.35	1.03
10.08	2.29	0.77	1.91
23.04	6.18	3.31	5.99
30.24	7.95	4.76	7.83
37.44	8.60	6.15	8.45
40.32	8.66	6.66	8.50
44.64	8.69	7.30	8.52
51.84	8.70	7.89	8.52
60.48	8.70	8.06	8.52
64.80	8.70	8.08	8.52
70.56	8.70	8.08	8.52

○ *Pathogen Modeling Program*

Uma vez que este programa assume, como mínimo, uma salinidade de 0,5%, para este creme, os resultados serão iguais aos obtidos pelo creme CQ2 (pH igual). Assim, não irão ser aqui demonstrados os resultados que se obteriam, mas pode-se ter em conta os resultados do produto CQ2 para discuti-los.

Recorrendo à ferramenta *ComBase*, e aos resultados expressos na tabela 4.15, torna-se possível verificar que a dose infecciosa de *E. coli* O157:H7 é atingida por volta de 5.76 horas após elaboração do creme. Passado pouco mais de sete horas, atinge-se a dose infecciosa de *Salmonella*, que tem um crescimento muito semelhante a *E. coli*, nestes parâmetros. No entanto, este microrganismo só atinge a sua dose infecciosa após 23 horas. No caso de *S. aureus*, a sua dose infecciosa é obtida por volta de 37.44 horas após fabricação do creme.

Relativamente às fases estacionárias, a primeira é atingida pela *Salmonella* a pouco mais de 44 horas. No caso da *E. coli*, o seu crescimento estagna por volta das 51.84 horas. Para *S. aureus*, a curva de crescimento estabilizaria, aproximadamente, após 65 horas de elaboração do creme.

De acordo com a ferramenta PMP, e à tabela 4.10, torna-se possível observar que as doses infecciosas de *E. coli* são atingidas por volta de 11 horas, para a previsão sem fase de latência, e cerca de 17 horas, para o caso da previsão com fase de latência. No caso de *S. aureus*, existe uma maior diferença entre as duas previsões, cerca de 19 horas para previsão sem fase de latência e cerca de 31 horas para a previsão com fase de latência, manifestando uma maior dificuldade deste microrganismo em adaptar-se às condições do novo meio.

Relativamente à estabilização das curvas, tanto em *E. coli* como em *S. aureus*, as previsões com e sem fase de latência atingem a fase estacionária aproximadamente ao mesmo tempo. No caso de *E. coli*, as suas curvas estabilizam por volta das 50 horas. Para *S. aureus*, a estabilização das suas curvas dá-se por volta de 88 horas após elaboração do creme.

Capítulo 5 - Discussão de Resultados

Ao depararmos com os resultados obtidos, a primeira percepção que temos são as limitações inerentes às ferramentas de Microbiologia Preditiva utilizadas, que dificultaram algumas análises aos produtos.

Em ambas, tornou-se impossível obter qualquer informação relativamente à validade dos produtos em pó (devido ao reduzido a_w), podendo dar a ideia que este tipo de produtos são microbiologicamente seguros quando armazenados sob a forma de pó e não apresentam prazo de validade, o que não é aplicável. No entanto, a premissa que os produtos são microbiologicamente seguros não é de todo inválida, uma vez que, de acordo com a empresa, as maiores alterações que ocorrem nos produtos em pó, que lhes alterem os prazos de validade, são ao nível macroscópico.

Apesar dos cremes em pó CQ1 e CQ2 sofrerem um aquecimento da água durante a sua elaboração, ambas as ferramentas de Microbiologia Preditiva não têm em conta este factor, que poderia contribuir para a inibição do crescimento microbiano.

No caso dos produtos líquidos, os resultados obtidos dão a ideia que são produtos facilmente perecíveis, durando apenas poucos dias ou horas. Como referido anteriormente, estes produtos têm validade de cerca de 9 meses (12 meses no caso do RL4, com pH inferior a 3,5). Logo, é fácil concluir que este tipo de programas, ao não considerarem passos de pasteurização e/ou selagem a vácuo, não nos fornecem informação adequada ao objectivo proposto.

Uma comparação entre as análises microbiológicas, feitas por um laboratório externo à ENF, aos produtos líquidos e os resultados obtidos recorrendo às ferramentas de Microbiologia Preditiva, permitem comprovar a inviabilidade destas ferramentas na análise deste tipo de cremes, uma vez que, mesmo passadas algumas semanas, todos os produtos se encontram dentro dos limites da empresa, contrariamente ao que era previsto pelas ferramentas de Microbiologia Preditiva:

RL1 - As últimas análises microbiológicas realizadas a este produto determinaram que, após cinco dias, o creme ainda se encontrava dentro dos limites microbiológicos. No entanto, a análise deste creme utilizando ferramentas de Microbiologia Preditiva levou a concluir que, em menos de dez horas já se tinham ultrapassado alguns limites da empresa e até teria sido suficiente para se atingirem doses infecciosas de *E. coli* O157:H7 e de *Salmonella*.

RL2 - As análises microbiológicas mais recentes garantiam um produto que ainda se encontrava dentro dos limites, passados vinte dias da fabricação do mesmo. Recorrendo às ferramentas de Microbiologia Preditiva, concluir-se-ia que após dez horas o produto já se encontraria fora de certos limites e já haveria a possibilidade de se chegarem a doses infecciosas de *E. coli* O157:H7 e de *Salmonella*.

RL3 - Os últimos resultados obtidos de análises microbiológicas para este produto classificavam-no como "OK" passados quinze dias da data de produção do creme. No entanto, as ferramentas de Microbiologia Preditiva dariam um produto "NÃO OK" passado apenas oito horas da elaboração do creme, atingindo-se, também, doses infecciosas de *E. coli* O157:H7 e de *Salmonella*.

RL4 - As análises realizadas mais recentemente, demonstraram que o produto ainda era seguro, a nível microbiológico, passados treze dias da data de produção. No entanto, recorrendo às ferramentas de Microbiologia Preditiva, não foi possível concluir nenhuma previsão devido ao baixo pH.

RL5 - Este produto, de acordo com as análises externas, passados vinte e três dias ainda se encontravam dentro dos limites admitidos pela empresa. Por outro lado, a análise recorrendo às ferramentas de Microbiologia Preditiva, estimavam que, após oito horas, o creme já se encontraria fora de alguns limites, e, a dose infecciosa de *Salmonella* já teria sido atingida.

Como é possível verificar, a ENF não tem a política de analisar os cremes em pó após elaboração, analisando apenas o produto em pó e os produtos líquidos. Neste trabalho, teria sido benéfico ter essa informação relativamente aos produtos em pó, pois permitiria comparar com os resultados obtidos pelas ferramentas de Microbiologia Preditiva, tal como foi feito para os Recheios Líquidos, e concluir se a utilização desta abordagem seria uma mais-valia, ou não, para a empresa e para os seus clientes.

Olhando para os programas caso a caso, as maiores dificuldades com que nos deparamos, utilizando o *ComBase*, é o facto de, ao termos valores que não encaixam dentro dos limites microbiológicos propostos pela ferramenta, torna-se impossível a análise dos cremes, para determinado microrganismo, dando a ideia de um produto microbiologicamente seguro para esse patógeno.

No caso do PMP, apresentam-se três limitações "graves". Como referido antes da exposição dos resultados, na análise para a presença de *Salmonella*, apenas considera a temperatura como factor de crescimento, o que é algo limitante para uma correcta análise dos produtos. Outra dificuldade que surge, utilizando esta ferramenta, é o facto de assumir um valor inicial de inóculo de 10^3 UFC/gr, colocando, logo à partida, os valores acima dos limites impostos pela ENF. A terceira limitação, que surge no caminho do utilizador, prende-se no facto deste programa apenas permitir inserir um valor mínimo de salinidade de 0,5%, que, no caso destes cremes, somente nos permite analisar, com alguma exactidão, dois (CQ1 e CQ2) dos dez cremes em estudo (%NaCl > 0,5). Um outro factor algo curioso, prende-se com o facto de o PMP analisar *E. coli* recorrendo apenas aos resultados para a estirpe O157:H7, no entanto, ao assumir um valor inicial de inóculo de 10^3 UFC/gr, este já se encontra acima da dose infecciosa para este microrganismo. Deste modo, se

pretendermos prever quando é que este microrganismo atinge a sua dose infecciosa, estamos impossibilitados de o realizar.

Em ambos, um valor de pH fora dos limites das ferramentas impossibilita qualquer tipo de análise, como verificado em alguns casos. Além disso, assumem o pior caso possível (*worst case scenario*), o que, também, pode dificultar algumas determinações e análises, fugindo um pouco à realidade observada.

Tendo em conta as limitações deparadas ao longo do processo de análise, e aqui expostas, podemos concluir que o *ComBase* se apresenta como uma melhor ferramenta, pois permite inserir parâmetros mais próximos daqueles que correspondem à realidade dos cremes, permitindo uma análise de certa forma mais correcta e que poderia reflectir os crescimentos microbianos com maior veracidade.

Posto isto, o objectivo final de determinar prazos de validade para os cremes de pasteleiro não se tornou possível. Apesar disso, concluiu-se que a capacidade e a viabilidade destes programas, na sua possível aplicação directamente na indústria, não é aplicável, neste caso, devido aos obstáculos apresentados. No entanto, poder-se-ia considerar os resultados obtidos para analisar os cremes após preparação, e abertura (no caso dos recheios líquidos), momento a partir do qual a exposição às condições do meio envolvente é maior.

Apesar deste tipo de produtos ser de consumo rápido, uma vez que não é hábito ver bolos com creme mais de um dia à venda, a obtenção de resultados com doses infecciosas atingidas em menos de seis horas, por exemplo, poderia levar a conclusões erróneas e, se seguidas "à risca", à retirada de produtos de qualidade dos pontos de venda, levando a consequentes perdas financeiras.

Conclusão

O facto do objectivo final não ter sido atingido, pode levar à falsa ideia que o tempo e o trabalho investidos nesta dissertação foram em vão. No entanto, estes resultados permitiram retirar uma série de ilações, que de outro modo poderiam passar despercebidas.

Em praticamente todas as referências, existem alusões ao facto de que os resultados obtidos com estas ferramentas ainda não serem 100% fiáveis, que devem ser vistos como um auxílio à análise dos produtos e não substituem, na totalidade, as análises microbiológicas laboratoriais. Aqui, foi possível verificar a veracidade destes factos.

Como referido anteriormente, estas ferramentas são maioritariamente utilizadas na análise de produtos bastante perecíveis, como carne e derivados, peixe e conservas. Em conversa pessoal com Bas Walraven (Departamento de Investigação do Cosun Food Technology Center, Holanda), fui informado que houve, há poucos anos, uma tentativa para desenvolver uma ferramenta de Microbiologia Preditiva que permitisse a análise de produtos de pastelaria, incluindo cremes de pasteleiro. No entanto, esse projecto revelou-se bastante complicado, tendo-se chegado a um ponto em que estava apenas disponível uma folha de Excel, com um elevado número de fórmulas e de utilização muito complexa para os utilizadores em geral, tendo o projecto sido abandonado.

Torna-se possível concluir que a tecnologia que se encontra disponível, hoje em dia, ainda não permite desenvolver ferramentas suficientemente rápidas e eficazes, que assumam um maior número de factores extrínsecos e, essencialmente, intrínsecos (incluir outros aditivos e conservantes presentes nos alimentos, para além do sal, por exemplo), que permitam análises mais correctas de outros géneros alimentícios, para além dos habituais nestas análises.

Assim, pode-se verificar que estas ferramentas, apesar de não terem permitido atingir o objectivo de determinar prazos de validade, permitiram analisar os cremes após preparação, podendo vir a ser úteis, não para a empresa em questão, mas, talvez, para os seus clientes finais.

Perspectivas futuras

A Microbiologia Preditiva é uma área em constante desenvolvimento desde os últimos anos. Ao expor as limitações das suas ferramentas, estamos a auxiliar a área, promovendo a correcção das mesmas, de forma a criar ferramentas mais aptas para utilização no dia-a-dia, e, de certa forma, promover mais pesquisa, podendo levar a um crescimento da Microbiologia Preditiva, que, em minha opinião, tem ainda um grande futuro pela frente.

A evolução desta tecnologia terá de ter em conta mais factores, para além dos mais comuns em todas as ferramentas (temperatura, pH, a_w e/ou salinidade), como por exemplo a existência de outros conservantes ou os diferentes processos de conservação, como pasteurização e embalagem a vácuo.

Acredita-se que se chegará a um patamar em que se tornará possível criar modelos híbridos que considerem tanto a perspectiva populacional como a individual dos microrganismos e que, quando chegar essa possibilidade, irão surgir ferramentas preditivas bastante mais eficientes e fiáveis do que as disponíveis actualmente, tornando-se ainda necessários avanços tecnológicos.

Sendo uma área multidisciplinar, a evolução terá de surgir das quatro principais áreas científicas. Estas terão de trabalhar conjuntamente, pois um crescimento individual de apenas uma determinada área iria "desequilibrar" a harmonia existente entre as mesmas.

Crê-se que o futuro da Microbiologia Preditiva passará por *hardwares* mais capazes, com grande aptidão em termos de velocidade de processamento de dados, e por *softwares* mais completos, que abranjam um maior número de condições, contribuindo para isso uma investigação mais orientada para este propósito e um maior conhecimento dos agentes, tanto dos microrganismos (fisiologia, bioquímica, etc.) como de uma gama mais vasta de alimentos. Este conhecimento levará, também, à criação de novos modelos, adaptados a novas realidades que surgirão, entretanto.

O crescimento da Microbiologia Preditiva terá sempre em vista o aumento da fiabilidade dos resultados, podendo levar a uma maior divulgação e a um maior abrangimento da sua utilização por parte das indústrias alimentares.

A realização de análises microbianas aos cremes em pó, após reconstituição, seria interessante, de forma a obter dados experimentais que, juntamente com as análises dos líquidos, forneceriam informação relevante para o conhecimento do crescimento microbiano neste tipo de produtos. Esta informação poderia ser o passo inicial necessário para o desenvolvimento de modelos matemáticos e, consequentemente, para o desenvolvimento de ferramentas aplicáveis a estes produtos alimentares.

Referências Bibliográficas

1. Anastácio, A., *Microbiologia Preditiva Alimentar: As sinergias entre a microbiologia, a matemática e as tecnologias da informação*. Segurança e Qualidade Alimentar, 2009. **7**: p. 56-59.
2. McMeekin, T.A., Ross, T., *Predictive Microbiology: providing a knowledge-based framework for change management*. International Journal of Food Microbiology, 2002. **78**: p. 133-153.
3. Ross, T., McMeekin, T.A., *Predictive Microbiology*. International Journal of Food Microbiology, 1994. **23**: p. 241-264.
4. McDonald, K., Sun, D., *Predictive food microbiology for the meat industry: a review*. International Journal of Food Microbiology, 1999. **52**: p. 1-27.
5. Tauxe, R.V., *Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge*. Emerging Infectious Diseases, 1997. **3**(4): p. 425-433.
6. Baranyi, J., Roberts, T.A., *Mathematics of predictive food microbiology*. International Journal of Food Microbiology, 1995. **26**: p. 199-218.
7. Corradini, M.G., et al., *Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software*. International Journal of Food Microbiology, 2006. **106**: p. 223-228.
8. Sautour, M., et al., *A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity*. International Journal of Food Microbiology, 2001. **67**: p. 63-69.
9. Baranyi, J., et al., *Validating and comparing predictive models*. International Journal of Food Microbiology, 1999. **48**: p. 159-166.
10. Mafart, P., *Food engineering and predictive microbiology: on the necessity to combine biological and physical kinetics*. International Journal of Food Microbiology, 2005. **100**: p. 239-251.
11. Ferrer, J., et al., *Mathematical modelling methodologies in predictive food microbiology: A SWOT analysis*. International Journal of Food Microbiology, 2009. **134**: p. 2-8.
12. McMeekin, T.A., et al., *The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations*. International Journal of Food Microbiology, 2008. **128**: p. 2-9.
13. <http://portal.arserrc.gov/>. Predictive Microbiology Information Portal Janeiro de 2011].
14. Ross, T., *Predictive Microbiology*, in *SEAFast Center Symposium*. 2009: Bogor.
15. Malakar, P.K., et al., *Relevance of microbial interactions to predictive microbiology*. International Journal of Food Microbiology, 2003. **84**: p. 263-272.
16. <http://pt.encydia.com/es/Bacteria>. Bactéria Janeiro de 2011].
17. Brul, S., et al., *Microbial systems biology: New frontiers open to predictive microbiology*. International Journal of Food Microbiology, 2008. **128**: p. 16-21.

18. <http://www.combase.cc>. *ComBase* - Common Database for Predictive Microbiology Janeiro de 2011].
19. <http://pmp.arserrc.gov/>. Pathogen Modelling Program (PMP) Online Janeiro de 2011].
20. Petridis, H.e.a., *E. coli O157:H7 A Potential Health Concern*. Institute of Food and Agricultural Sciences (IFAS) - University of Florida, 2002. **SL146**.
21. <http://www.fda.gov/default.htm>. United States Food and Drug Administration Janeiro de 2011].
22. Adams, J., *Microbial evolution in laboratory environments*. Research in Microbiology, 2004. **155**: p. 311-318.
23. Cassin, M.H., *et al.*, *Simulation Modeling for Microbial Risk Assessment*. Journal of Food Protection, 1998. **61**(11): p. 1560-1566.
24. Corradini, M.G., Peleg, M., *Shelf-life estimation from accelerated storage data*. Trends in Food & Technology 2007. **18**: p. 37-47.
25. Davey, K.R., *Modelling the combined effect of temperature and pH on the rte coefficient for bacterial growth*. International Journal of Food Microbiology, 1994. **23**: p. 295-303.
26. Geeraerd, A.H., *et al.*, *Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling*. International Journal of Food Microbiology, 2004. **91**: p. 229-244.
27. Leporq, B., *et al.*, *The "Sym'Previus" software, a tool to support decisions to the foodstuff safety*. International Journal of Food Microbiology, 2005. **100**: p. 231-237.
28. Marks, H.M., Coleman, M.E., *Accounting for inherent variability of growth in microbial risk assessment*. International Journal of Food Microbiology, 2005. **100**: p. 275-287.
29. McClure, P.J., *et al.*, *Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach*. International Journal of Food Microbiology, 1994. **23**: p. 265-275.
30. McMeekin, T.A., *et al.*, *Predictive microbiology: towards the interface and beyond*. International Journal of Food Microbiology, 2002. **73**: p. 395-407.
31. Pin, C., Baranyi, J., *Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organisms*. International Journal of Food Microbiology, 1998. **41**: p. 59-72.
32. Whiting, R.C., *et al.*, *Determining the microbiological criteria for lot rejection from the performance objective or food safety objective*. International Journal of Food Microbiology, 2006. **110**: p. 263-267.
33. Zwietering, M.H., *et al.*, *Modeling of the Bacterial Growth Curve*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. **56**(6): p. 1875-1881.